

ZUR PRIMÄR- UND
SEKUNDÄRSTRUKTUR DES
HÄMOCYANINS DER VOGELSPINNE
EURYPELMA CALIFORNICUM

Peter Reisinger

*Des
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUR PRIMÄR- UND SEKUNDÄRSTRUKTUR
DES HÄMOCYANINS DER VOGELSPINNE
EURYPELMA CALIFORNICUM

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Peter Reisinger
aus München

Mai 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hugo Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.7.1985

Meinen Eltern

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen für sein großes Interesse, seine wertvollen Anregungen und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Walter Schartau für die kollegiale Zusammenarbeit und die Durchführung der Aminosäure-Analysen.

Danken möchte ich auch sehr Herrn Prof. Dr. Hugo Scheer und Herrn Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger, Institut für Botanik der Universität München, für die Möglichkeit zur Durchführung der CD-Spektroskopie in ihrem Institut.

Bei Herrn Dr. Hans Deisenhofer, Abteilung für Strukturforschung des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried, möchte ich mich für die Erlaubnis zur Benutzung der Rechenanlage bedanken.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	5
I. Chemikalien	5
II. Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung	6
III. Methoden	6
1. Isolierung des Hämocyanins (37 S) und der Untereinheiten	6
2. Proteinquantifizierung	7
3. Dialyse und Entsalzung	7
4. Konzentrierungsmethoden	8
5. Mercaptolyse und SH-Gruppen-Alkylierung	8
6. Chemische Spaltungen	9
a) Spaltung mit Bromcyan	9
b) Spaltung mit Salzsäure	9
7. Enzymatische Spaltungen	9
a) Spaltung mit Trypsin	9
b) Spaltung mit Chymotrypsin	10
c) Spaltung mit Astacus-Protease	10
d) Spaltung mit Staphylococcus aureus V8-Protease	11
8. Chromatographische Verfahren	11
a) Gelfiltration	11
b) Ionenaustausch-Chromatographie	11
c) Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie	12
9. Elektrophoresen	12
a) Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
b) Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
c) Immunelektrophorese	13
10. Aminosäureanalyse	14
11. Endgruppenbestimmung und Sequenzierung	14
a) Endgruppenbestimmung und manuelle Sequenzierung	14
b) Sequenzierung mit dem Festphasensequenator	15
12. UV-Spektroskopie	15
13. Circular dichroismus-Spektroskopie	15
14. Computerisierte Chou/Fasman-Vorhersage der Sekundärstruktur	16

C. ERGEBNISSE	18
I. Untersuchungen zur Primärstruktur der Untereinheit <u>d</u>	18
1. Strategie der Sequenzanalyse	18
2. Anfangssequenz der Untereinheit <u>d</u>	19
3. Trennung von <u>d</u> -Tn 34 und <u>d</u> -Tn 37	19
4. Peptide aus <u>d</u> -Tn 34	21
a) Bromcyan-Spaltung von <u>d</u> -Tn 34	21
b) Nachspaltung des Peptids 34-CB 8	25
c) Trypsin-Spaltung von <u>d</u> -Tn 34	27
d) Nachspaltung von 34-T-Peptiden	37
5. Peptide aus <u>d</u> -Tn 37	40
a) Bromcyan-Spaltung von <u>d</u> -Tn 37	40
b) Nachspaltung der Peptide 37-CB 7 und 37-CB 8	47
c) Trypsin-Spaltung von <u>d</u> -Tn 37	50
d) Nachspaltung von 37-T-Peptiden	62
6. Peptide aus einem Gemisch von <u>d</u> -Tn 34 und <u>d</u> -Tn 37	64
a) Säure-Spaltung	64
b) Trypsin-Spaltung	66
7. Vollständige Primärstruktur der Untereinheit <u>d</u>	74
II. Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Vogelspinnen-Hämocyanin	87
1. Computerisierte Chou/Fasman-Methode an den Untereinheiten <u>d</u> und <u>e</u>	87
2. Circular dichroismus-Spektroskopie	104
a) CD-Spektren des nativen Hämocyanins	104
b) CD-Spektren der Hämocyanin-Untereinheiten	107
D. DISKUSSION	121
I. Die Primärstruktur von Vogelspinnen-Hämocyanin	121
1. Methoden und Probleme bei der Sequenzanalyse	121
2. Charakteristika der Untereinheit <u>d</u>	125
3. Vergleich mit der Untereinheit <u>e</u> und anderen homologen Proteinen	129
II. Zur Sekundärstruktur von Vogelspinnen-Hämocyanin	136
1. Vorhersage aus der Primärstruktur	136
2. CD-Spektroskopie: Raumstruktur und deren Änderung	140
E. ZUSAMMENFASSUNG	149
F. LITERATURVERZEICHNIS	151

ABKÜRZUNGEN UND NOMENKLATUR

AS	Aminosäure
APG	3-Aminopropyl-Glas
BrCN	Bromcyan
CD	Circulardichroismus
CM-	Carboxymethyl-
C-Terminus	Carboxyl-Ende eines Proteins oder Peptids
DABITC	4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat
DABTH-Aminosäure	4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-thiohydantoin-Derivat einer Aminosäure
DEAE	Diethylaminoethyl-
desox	desoxygeniert
DITC	p-Phenylendiisothiocyanat
DITC-Glas	p-Phenylendiisothiocyanat-Derivat von 3-Aminopropyl-Glas
EDC	1-Ethyl-3-dimethylaminopropylcarbodiimid
HC	Hämocyanin
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie
I	Ionenstärke
Mr	relative Molekülmasse
N-Terminus	Amino-Ende eines Proteins oder Peptids
ox	oxygeniert
PITC	Phenylisothiocyanat
PTH-Aminosäure	Phenylthiohydantoin-Derivat einer Aminosäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
TPCK	L-(1-Tosylamido-2-phenyl)ethylchloromethylketon
UE	Untereinheit

Drei- und Ein-Buchstaben-Symbole der Aminosäuren:

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure

Asx	B	Asparagin oder Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Glx	Z	Glutamin oder Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

d-Tn 34 und d-Tn 37 sind die zwei großen Bruchstücke, die durch limitierte Trypsinolyse der Untereinheit d erhalten werden.

Die übrigen Peptide wurden nach der Spaltmethode gekennzeichnet:

AC	Salzsäure
AP	<u>Astacus</u> -Protease
CB	Bromcyan
Ch	Chymotrypsin
SP	<u>Staphylococcus aureus</u> -Protease
T	Trypsin

Die AC-, CB- und T-Peptide wurden nach ihrem Auftreten in der Sequenz vom Amino- zum Carboxyl-Ende numeriert. Die vorangestellte Zahl "34" oder "37" bedeutet, daß ein Peptid aus der Spaltung eines der zwei großen Bruchstücke hervorging (z.B.: 34-T 1). Aus der Nachspaltung mit einem anderen Enzym hervorgehende Peptide wurden nach der Reihenfolge ihres Auftretens im Ausgangs-peptid numeriert (z.B.: 34-T 3-Ch 2).

A. EINLEITUNG

Atmungspigmente sind Proteine, die für einen effektiven Sauerstofftransport in höher organisierten Tieren sorgen. Den Eisen enthaltenden Atmungspigmenten, die dieses entweder direkt ans Protein (Hämerythrin) oder an eine prosthetische Gruppe gebunden (Chlorocruorin, Hämoglobin) enthalten, kann man die Kupfer-haltigen Hämocyanine gegenüberstellen. Während die Hämerythrine immer in Zellen vorkommen und die Hämoglobine entweder in Zellen oder frei im Blutplasma, sind die Chlorocruorine und die Hämocyanine immer im Blutplasma bzw. der Hämolymphe gelöst. Die Hämocyanine besitzen keine prosthetische Gruppe. Bei ihnen sind die Sauerstoff-bindenden Kupferatome direkt an den Proteinanteil gebunden.

Hämocyanine findet man im Stamm der Mollusken bei Cephalopoden, Gastropoden und Amphineuren, im Stamm der Arthropoden bei Crustaceen, Cheliceraten (Xiphosuren und Arachniden) und Myriapoden (Zusammenfassungen: VAN HOLDE und MILLER, 1982; ELLERTON et al., 1983). Ob die Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine monophyletischen Ursprungs sind, oder ob sie sich unabhängig voneinander entwickelt haben, konnte noch nicht geklärt werden.

Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanine zeigen grundlegende Unterschiede in ihrer Quartärstruktur (VAN BRUGGEN et al., 1981). Mollusken-Hämocyanine sind zylindrische Riesenmoleküle. Das Hämocyanin der Weinbergschnecke Helix pomatia (Gastropoden) z.B. hat eine Molekülmasse von 9 Millionen und einen Sedimentationskoeffizienten von 100 S. Das Molekül läßt sich reversibel in 1/2 (60 S)-, 1/10 (20 S)- und 1/20 (11 S)-Moleküle zerlegen. Das 1/20-Molekül, das einer Polypeptidkette entspricht, hat noch eine Molekülmasse von ca. 400000 - 450000 Dalton. Es kann enzymatisch in 8 Domänen gespalten werden. Eine Domäne hat eine Molekülmasse von 50000 Dalton und entspricht der kleinsten funktionellen Einheit (2 Kupferatome zur Bindung eines Sauerstoffmoleküls). Arthropoden-Hämocyanine dagegen bestehen speziesabhängig aus Hexameren (16 S), 2-Hexameren (24 S), 4-Hexameren (37 S) oder 8-Hexameren (60 S). Durch Alkalibehandlung zerfallen die Moleküle in ihre kleinsten funktionellen Untereinheiten (Polypeptidketten) mit einer Molekülmasse von ca. 70000 - 75000. In den letzten Jahren gelang die Isolierung und chemische Charakterisierung solcher Untereinheiten. Diese erwiesen

sich als heterogen, wobei abhängig von der systematischen Stellung bis zu 15 verschiedene Untereinheiten gefunden wurden (Zusammenfassung: LINZEN, 1983). Bei einigen Arthropoden-Hämocyaninen wurde die Lage der verschiedenen Untereinheiten im Molekül vor allem durch Kombination immunologischer mit elektronenmikroskopischen Methoden aufgeklärt (LAMY et al., 1981; MARKL et al., 1981; VAN BRUGGEN, 1983).

Das Hämocyanin der Vogelspinne Eurypelma californicum, das in unserer Arbeitsgruppe untersucht wird, besitzt eine Molekülmasse von $1,8 \times 10^6$ Dalton und besteht aus 24 Untereinheiten. Durch Alkalibehandlung läßt es sich in die Monomere a, d, e, f, g und die Dimere bc und ff zerlegen (MARKL et al., 1976; SCHNEIDER et al., 1977; MARKL et al., 1979). Das Eurypelma-Hämocyanin gehört zu den phylogenetisch älteren Cheliceraten-Hämocyaninen (Pfeilschwanzkrebse, Skorpione und primitive Spinnen), die eine homogene Gruppe oligomerer Proteine mit 4×6 oder 8×6 Untereinheiten darstellen. Man findet sowohl einen normalen Bohr-Effekt, z.B. bei der Vogelspinne (LOEWE, 1978) und dem Skorpion (LAMY et al., 1980), als auch umgekehrten Bohr-Effekt, z.B. bei Limulus (REDFIELD, 1930) und außergewöhnlich hohe Kooperativität (LOEWE et al., 1977; LOEWE, 1978; LAMY et al., 1980).

Die konservative Quartärstruktur dieser Hämocyanine scheint mit dem Vorkommen von 7 - 8 unterschiedlichen Untereinheiten verknüpft zu sein (MARKL et al., 1979; MARKL und KEMPTER, 1981; LINZEN, 1983). In den wenigen gut untersuchten Hämocyaninen zeigen die verschiedenen Untereinheiten-Typen innerartlich keine immunologische Kreuzreaktion, zwischen verschiedenen Spezies jedoch sind solche bei einander korrespondierenden Untereinheiten nachweisbar (LAMY et al., 1979; LAMY, 1983; MARKL et al., 1983). Reassembly-Experimente zeigten, daß zum Aufbau des Eurypelma-Hämocyanins alle sieben Untereinheiten notwendig sind (MARKL et al., 1982). Jede Untereinheit besitzt demnach eine spezifische Rolle beim Aufbau des Gesamtmoleküls. Der architektonischen Funktion der verschiedenen Untereinheiten muß eine entsprechende molekular-physiologische Funktion gegenüberstehen. Welche Rolle dabei den verschiedenen Untereinheiten (z.B. am Bohr-Effekt und an der Kooperativität) zukommt, ist noch unklar.

Worauf beruht nun die Heterogenität der Hämocyanin-Untereinheiten? Der Vergleich von Bromcyan-Spaltmustern, tryptischen Fingerprints, Aminosäure-Analysen u. a. bei Eurypelma zeigte, daß die Heterogenität

der Untereinheiten nicht auf sekundären Modifikationen (post-translationalen Veränderungen, wie z.B. Kohlenhydrat-Seitenketten, Phosphorylierung, Abspaltung von N- oder C-terminalen Peptiden) beruht, sondern auf Unterschieden in der Aminosäure-Sequenz (MARKL et al., 1979; SCHARTAU et al., 1981). Um die Struktur und Funktion von Hämocyaninen vollständig zu verstehen, ist es daher wichtig, zunächst die Aminosäure-Sequenzen aller Untereinheiten einer Hämocyanin-Spezies aufzuklären. Die genaue Kenntnis der Primärstrukturen könnte dann das Verständnis der spezifischen Rolle der Untereinheiten für den Aufbau und die Funktion des oligomeren Moleküls erleichtern.

Die Kenntnis von Primärstrukturen ermöglicht aber auch evolutionäre Zusammenhänge auf molekularer Ebene zu erkennen. So konnte durch Sequenz-Analyse sehr vieler Hämoglobin-Spezies ein Wirbeltier-Stammbaum aufgestellt werden, der sehr gut mit dem klassischen, auf morphologischen Befunden basierenden übereinstimmt (ZUCKERKANDL, 1965; DICKERSON und GEIS, 1983). Der Vergleich von Hämocyanin-Sequenzen verschiedener systematischer Gruppen könnte tiefere Einblicke in die Phylogenie der Molekülstruktur des Hämocyanins und der dazugehörigen systematischen Gruppen gewähren.

Es stellte sich daher für mich die Aufgabe, in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. W. Schartau und meiner Kondaktorandin F. Eyerle, die Untereinheit d des Hämocyanins aus der Vogelspinne Eurypelma californicum durch verschiedene Spaltmethoden in definierte Bruchstücke zu zerlegen, welche durch chromatographische Methoden isoliert und dann mit einem modifizierten Edman-Abbau sequenziert werden sollten.

Die Primärstruktur eines Proteins enthält bereits sämtliche Vorbedingungen für die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur (ANFENSEN, 1973). Dennoch kann man bis heute nicht von der Primärstruktur detailliert auf die übrigen Strukturebenen schließen. In beschränktem Maße gelingt dies nur für die Sekundärstruktur. Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war daher, aus den aufgeklärten Primärstrukturen der Untereinheiten d und e (SCHARTAU et al., 1983; SCHNEIDER et al., 1983) Sekundärstruktur-Vorhersagen nach den Methoden von CHOU und FASMAN (1978) durchzuführen.

Ein weiterer Ansatz, Aussagen zur Sekundärstruktur und zu Teilaspekten der Raumstruktur zu machen, ist die Circular dichroismus-Spektroskopie. Das Vogelspinnen-Hämocyanin, als Vertreter eines Cheliceraten-Hämo-

cyanins, sollte daher als Gesamtmolekül (37 S) mit der Methode der CD-Spektroskopie untersucht, und die Ergebnisse mit denen an anderen Hämocyaninen verglichen werden. Weiterhin wurden die isolierten Untereinheiten CD-spektroskopisch untersucht, um Hinweise auf mögliche Unterschiede auch in der Sekundärstruktur zu erhalten.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Chemikalien

Alle Reagenzien waren von p.a.-Qualität. Sie wurden von Merck bezogen, mit Ausnahme von:

Bio-Gel A-5m BIORAD, Richmond, California/USA

Eichproteine für die Mr-Bestimmung BOEHRINGER, Mannheim
Aminosäuren-Eichgemisch
Chymotrypsin

4-N,N-Dimethylaminoazobenzol- FLUKA, Neu-Ulm
4'-isothiocyanat (DABITC)

Stickstoff (nachgereinigt) LINDE, München
Argon

Ultrogel Aca 44 LKB-Produkter, Bromma/Schweden
Agarose M

Staphylococcus aureus V8-Protease MILES, Elkhart, Indiana/USA

Trypsin (TPCK-behandelt) MILLIPORE CORPORATION, Bedford,
Massachusetts/USA

Sephadex G-10 PHARMACIA, Uppsala/Schweden
Sephadex G-25, G-100 superfine
Sephacryl S-300 superfine
DEAE-Sepharose CL-6B
CM-Sepharose CL-6B

Pico-Puffer-System PIERCE, Rockford, Illinois/USA

Bromphenolblau . SERVA, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin SERVA, Heidelberg
(TEMED)
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Polyethylenglycol (Mr 20000)
Visking-Dialysesschläuche

Bromcyan SIGMA, Taufkirchen
Isoandrosteron

Polyamid-Fertigfolien SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel

Acrylamid SCHUCHARD, München
N,N'-Methylenbisacrylamid

Astacus-Protease Geschenk von Prof. Zwilling,
Heidelberg

II. Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung

Die im Süden und Südwesten der USA verbreitete Vogelspinne Eurypelma californicum wurde wie früher beschrieben gehalten (LOEWE und LINZEN, 1973). Nach vorheriger etwa 1-stündiger Kühlung bei 4°C wurde die Hämolymphe, ungeachtet des Geschlechts und des Alters der Tiere, durch Punktion des dorsal gelegenen Herzens entnommen (LOEWE und LINZEN, 1973). Sofortige Entfernung der Hämocyten durch Zentrifugation verhinderte die Gerinnung. Die Ausbeute pro Tier lag etwa zwischen 0,3 und 1,2 ml. Nach einer Erholungszeit von ca. 3 Monaten konnten die Spinnen erneut punktiert werden. Diese Arbeiten wurden meist von Herrn M. Baumann und Herrn T. Fincke durchgeführt.

III. Methoden

1. Isolierung des Hämocyanins (37 S) und der Untereinheiten

Das Hämocyanin (37 S) wurde über Bio-Gel A 5m in Tris/HCl, pH 8,0 (I = 0,05), vom Begleitprotein abgetrennt. Nach Dialyse des Hämocyanins

gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6 ($I = 0,05$) und nachfolgender Fraktionierung über Ultrogel AcA 44 in demselben Puffer wurde ein Monomeren-gemisch (a, d, e, f, g) und ein Dimerengemisch (bc und ff) erhalten (SCHNEIDER et al., 1977).

Die Monomere a, d und e wurden durch Ionenaustausch-Chromatographie des Monomeren-gemisches über DEAE-Sepharose CL-6B gewonnen (SCHNEIDER et al., 1980).

Die Untereinheit a wurde durch Rechromatographie über denselben Ionenaustauscher nachgereinigt.

Die Untereinheit g wurde in zwei Schritten isoliert. Zunächst wurde das Monomeren-gemisch einer präparativen Gelelektrophorese unterworfen (SCHNEIDER et al., 1977), wodurch die Untereinheiten d und f abgetrennt wurden. Das a, e, g - Gemisch wurde dann über DEAE-Sepharose CL-6B getrennt (siehe oben).

Zur Isolierung des Heterodimers bc und des f-Monomers wurde das Dimeren-gemisch gegen Glycin/NaOH-Puffer, 50 mM Cystein, dialysiert. Dabei zerfällt das Homodimer ff in das Monomer. Dieses konnte dann vom Heterodimer über Sephadex G-100 superfine abgetrennt werden (SCHNEIDER et al., 1977).

Die Reinheit der Untereinheiten wurde durch zweidimensionale Immunelektrophorese getestet.

2. Proteinquantifizierung

Der Gehalt an Hämocyanin (37 S), Untereinheiten und an den großen Bruchstücken aus der limitierten Trypsinolyse wurde routinemäßig durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Bei einer optischen Weglänge von 1 cm entspricht eine Extinktionseinheit ca. 1 mg Protein/ml (LOEWE und LINZEN, 1973).

3. Dialyse und Entsalzung

Bei Proteinlösungen erfolgte Pufferwechsel oder die Abtrennung von niedermolekularen Substanzen (Entsalzung) durch Dialyse in Visking-Dialysesläuchen der Fa. Serva. Lösungen von Peptiden wurden über eine

Sephadex G-10-Säule (1,5 x 100 cm) in 5%iger (v/v) Essigsäure mit einer Flußrate von 10 ml/h entsalzt, wobei die Detektion der Peptide im Durchflußphotometer bei 206 und 280 nm erfolgte. Ammoniumhydrogencarbonat in Peptidlösungen wurde nach Zusatz von Essigsäure durch Lyophilisation entfernt.

4. Konzentrierungsmethoden

Proteinlösungen wurden durch Unterdruckfiltration in Visking-Dialysesschläuchen bei 4°C oder durch Dialyse gegen 20%iges (w/v) Polyethylenglycol (Mr 20000) im jeweiligen Puffer konzentriert. Proteine, die für längere Zeit aufbewahrt werden sollten, wurden nach Dialyse gegen flüchtige Puffer, 5%ige Essigsäure oder Wasser lyophilisiert. Peptidlösungen wurden bei 37°C unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer eingeeengt oder lyophilisiert.

5. Mercaptolyse und SH-Gruppen-Alkylierung

Die Mercaptolyse und SH-Gruppen-Alkylierung erfolgte nach der Methode von CRESTFIELD et al. (1963). Nach limitierter Trypsinolyse der Untereinheit d (siehe Abschnitt III.7.a) wurde das Lyophilisat (bis zu 30 mg Protein) in ca. 3 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,2, 6 M an Guanidin-Hydrochlorid, gelöst. Zur Reduktion der Disulfidbrücken (Mercaptolyse) wurden pro mg Protein 1 µl 2-Mercaptoethanol zugefügt und die Lösung zunächst 20 Min. bei 56°C, dann 1 Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Stickstoffstrom inkubiert. Zur Carboxymethylierung der SH-Gruppen wurden pro mg Protein 2,25 mg Jodessigsäure zugefügt, die zuvor in 1 NaOH gelöst worden war (10 µl 1 N NaOH/2,25 mg Jodessigsäure), und für 30 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur belassen. Nach der Reaktion wurde entweder nach Dialyse gegen Wasser im Dunkeln lyophilisiert oder direkt auf eine mit Aluminiumfolie abgedunkelte Sephacryl S-300 superfine-Säule (1,5 x 150 cm) aufgetragen (siehe Abschnitt III.8.a).

6. Chemische Spaltungen

a) Spaltung mit Bromcyan

Zur Spaltung mit Bromcyan wurde das denaturierte und carboxymethylierte Protein in 70%iger (v/v) Ameisensäure gelöst (4 mg Protein/ml) und ein in Bezug auf Methionin 70facher molarer Überschuß an Bromcyan (gelöst in wenig 70%iger Ameisensäure) zugefügt. Die Lösung wurde mit Stickstoff überschichtet und im Dunkeln (wenn nicht anders angegeben) für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zufügen des 10fachen Volumens an Wasser und Entgasen. Anschließend wurde lyophilisiert.

b) Spaltung mit Salzsäure

In Anlehnung an INGLIS et al. (1980) wurden 5 mg Protein in 10 ml 0,0125 M HCl (pH 2) gelöst. Die Lösung wurde mit Stickstoff überschichtet und für 2 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Die erkaltete Lösung wurde lyophilisiert.

7. Enzymatische Spaltungen

a) Spaltung mit Trypsin

Das in 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8,0, gelöste oder suspendierte, denaturierte und carboxymethylierte Protein (ca. 1 mg/ml) wurde mit 2 % (w/w) TPCK-behandeltem Trypsin, das im gleichen Puffer gelöst worden war, bei 37°C für 6 bis 8 Stunden unter leichtem Rühren inkubiert. Die Enzymlösung wurde vorher in zwei gleiche Volumina geteilt, und die zweite Hälfte nach 2 Stunden zugegeben. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Eisessig auf pH 4 und nachfolgende Lyophilisation beendet.

Zur limitierten Proteolyse der Untereinheit d wurde das nicht denaturierte und carboxymethylierte Protein ("native Trypsinspaltung") gegen 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8,0, dialysiert und wie oben beschrie-

ben mit Trypsin inkubiert (EVERLE, 1980). Die Inkubationsdauer betrug jedoch nur 4 Stunden. Das Lyophilisat wurde denaturiert und carboxymethyliert (Abschnitt III.5).

Zur tryptischen Spaltung von am Ionenaustauscher (CM-Sephadex CL-6B) irreversibel gebundenem Protein wurde der Ionenaustauscher (ca. 10-ml Gelbett) aus der Säule entfernt und mit $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8,0, äquilibriert durch wiederholtes Entfernen des Überstandes nach dem Absetzen des Gels. Die Gelsuspension (1/4 Gelbettvolumen, 3/4 Puffer-volumen) wurde mit insgesamt 2 % (w/w) TPCK-behandeltem Trypsin versetzt und für 5 Stunden bei 37°C unter leichtem Rühren inkubiert. Die zweite Hälfte der Trypsinlösung wurde nach 2 Stunden zugefügt. Nach 5 Stunden Inkubation wurde Natriumchlorid zur Lösung gegeben (ca. 2 M). Nach 15 Min. wurde das Gel abgenutscht und mit zwei Gelvolumina $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer nachgewaschen. Nach Ansäuern mit Eisessig auf pH 4 wurde das Gemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt und danach über Sephadex G-10 entsalzt.

b) Spaltung mit Chymotrypsin

Das in 1 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8,0, gelöste Peptid (ca. 0,01 mg/ml) wurde mit 4 % (w/w) Chymotrypsin bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 5 μl Toluol versetzt, um ein Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Eisessig und nachfolgende Lyophilisation beendet.

c) Spaltung mit Astacus-Protease

Die Spaltung mit Astacus-Protease wurde in Anlehnung an KRAUHS et al. (1981) durchgeführt. Das in 1 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 8,0, gelöste Peptid (ca. 0,02 mg/ml) wurde mit 2 % (w/w) Astacus-Protease bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Eisessig und nachfolgende Lyophilisation beendet.

d) Spaltung mit Staphylococcus aureus V8-Protease

Zur Glutaminsäure-spezifischen Spaltung wurden die in jeweils 0,5 bis 1 ml 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer, pH 7,8, gelösten Peptide (ca. 0,05 mg/ml) mit 3 % (w/w) Staphylococcus aureus V8-Protease bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Eisessig (pH 4) und nachfolgende Lyophilisation beendet (HOUMARD und DRAPEAU, 1972; DRAPEAU, 1977).

8. Chromatographische Verfahren

a) Gelfiltration

Zur Abtrennung von ungespaltener Untereinheit d und von Guanidin-HCl nach Reduktion und Carboxymethylierung des Spaltgemisches ("native Trypsinspaltung") wurde Sephacryl S-300 superfine verwendet. Die Säule (1,5 x 150 cm) war mit 0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, 8 M Harnstoff, äquilibriert. Es wurden bis zu 30 mg Protein aufgetragen und mit einer Flußrate von 8 ml/h eluiert.

Zur Vortrennung von Bromcyan-Peptiden wurde eine Sephadex G-25 superfine-Säule (1,5 x 100 cm) verwendet. Elutionsmittel war 0,2 N Essigsäure, wobei mit einer Flußrate von 4 ml/h eluiert wurde. Die Detektion der Peptide erfolgte mit Hilfe eines Durchflußphotometers bei 206 und 280 nm.

b) Ionenaustausch-Chromatographie

Der Kationenaustauscher CM-Sepharose CL-6B wurde mit Startpuffer (0,05 M Natriumacetat, pH 4,5, 8 M Harnstoff), äquilibriert und in eine Säule (1 x 15 cm) gefüllt. Es wurden bis zu 20 mg Protein aufgetragen und mit einem linearen NaCl-Gradienten (0 - 0,3 M; 300 + 300-ml) bei einer Flußrate von 6 ml/h eluiert. Das Volumen der Fraktionen betrug 3 ml. Die Detektion erfolgte mit einem Durchflußphotometer bei 206 und 280 nm.

c) Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie

Peptide aus chemischen und enzymatischen Spaltungen wurden häufig durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit C_{18} -reversed-phase-Säulen isoliert (Gerät: Modell 3500 B der Fa. Spectra Physics, Darmstadt). Die Peptidgemische wurden dazu in 100 bis 400 μ l Startpuffer, der im Fall des "Acetat-Systems" 10%ig an Ameisensäure war, gelöst und in Fraktionen von 10 oder 100 μ l auf die Säule aufgetragen.

Zwei Systeme wurden verwendet: 1. "Acetat-System": Es wurde eine 0,46 x 25 cm RP 18-Säule, 5 μ (Hibar-Fertigsäule RT 250-4, Fa. Merck, Darmstadt oder Sil100, Fa. Serva, Heidelberg) verwendet. Das Lösungsmittel A war 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, Lösungsmittel B enthielt 60 % Acetonitril in A, pH 6,0. Die Säulentemperatur betrug 63°C (KRATZIN et al., 1980). 2. "TFA-System": Es wurden entweder die oben erwähnten Säulen benützt oder eine 0,46 x 25 cm Vydac TP/RP-Säule, 10 μ (Fa. Chrompack). Lösungsmittel A war 0,1%ige (v/v) Trifluoressigsäure (in zweifach destilliertem Wasser), Lösungsmittel B enthielt 80 % Acetonitril in A. Die Trennung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bei beiden Systemen wurde der Gradient (100 % A bis 70 % B in A), dessen Steilheit konstant war, in 40 Min. durchlaufen. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 2 ml/Min., die Detektion der Peptide, die manuell fraktioniert wurden, erfolgte bei 210 nm. Die Fraktionen wurden lyophilisiert oder mit dem Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

9. Elektrophoresen

a) Analytische SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung denaturierter Proteine im analytischen Maßstab (5 - 10 μ g) wurde die Elektrophoreseapparatur der Fa. Hölzel (Dorfen, Obb.) verwendet. Peptide, die aus einem reduzierten und carboxymethylierten Protein oder Peptid hervorgegangen waren und in einem Harnstoff-haltigen (8 M), sauren Puffer getrennt worden waren, konnten nach Neutralisation mit 1 N NaOH auf das Gel aufgetragen werden. Andernfalls wurden die

Peptide mit 2 % SDS und 10 % 2-Mercaptoethanol bei 56°C 20 Min. denaturiert (WEBER und OSBORN, 1969). Enthielten die Proben keinen Harnstoff, wurde nach Denaturierung vor dem Auftragen Saccharose zugesetzt. Als Marker für die Laufstrecke im Gel und zur pH-Wert-Kontrolle wurde zu den Proben ein Tropfen Bromphenolblau gegeben.

Die Elektrophoresen wurden im Plattengelverfahren (Schichtdicke: 1,5 mm), pH 8,8 nach der Methode von LAEMMLI (1970) in einem linearen Gradienten von 10 - 20 % Acrylamid bei Raumtemperatur (Laufzeit ca. 4 Stunden) durchgeführt, wobei die Spannung bis zum Einwandern der Proben ins Sammelgel 80 V betrug, dann konstant 150 V. Das Sammelgel (pH 6,8) war 3%ig.

Das Eichproteingemisch wurde nach Denaturierung mit SDS und 2-Mercaptoethanol bei 56°C während 20 Min. aufgetragen (WEBER und OSBORN, 1969). Folgende Eichproteine wurden verwendet: Aprotinin (6500), Cytochrom c (12500), Chymotrypsin (25000), Aldolase (40000) und Rinderserumalbumin (68000).

Nach Anfärben der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue G 250 (BRAMHALL et al., 1969; WEBER und OSBORN, 1969) wurden die Gele mit einer Methanol/Eisessig/Wasser-Mischung (10:15:175) entfärbt.

b) Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Isolierung der Untereinheit g wurde als erster Schritt eine präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewandt. Die Versuche wurden mit dem Gerät Ultra Phor der Fa. Colora (Lorch) nach den Angaben der Gebrauchsanleitung durchgeführt. Die Trennung von bis zu 50 mg Protein (in 3 ml gelöst) erfolgte entsprechend dem System Nr. 1 nach MAURER (1971). Sonst wurde wie bei SCHNEIDER et al. (1977) verfahren.

c) Immunelektrophorese

Zweidimensionale Immunelektrophorese wurde nach WEEKE (1973) in einer Apparatur von LKB (Modell 2117 Multiphor) von Herrn W. Stöcker durchgeführt. Das Gel bestand aus 1 % Agarose M (LKB) in 0,12 M Natrium-

barbiturat-Puffer, pH 8,6, I = 0,02. Als Trägermaterial dienten Plastikplatten (5 x 5 cm) der Fa. LKB. Für die zweite Dimension wurden 50 µl Antiserum pro 2 ml Gel eingesetzt. Das Antiserum gegen dissoziiertes Hämocyanin wurde wie früher beschrieben hergestellt (LAMY et al., 1979).

10. Aminosäureanalyse

Für die Aminosäureanalyse wurden routinemäßig 1-2 nMol Peptid in 100 µl konstant siedender HCl (ca. 6 N) aufgenommen und in zugeschmolzenen Ampullen 24 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Nach Trocknung der Proben im Exsiccator wurde das Hydrolysat zweimal mit bidestilliertem Wasser versetzt und nach erneuter Trocknung im Analysenpuffer aufgenommen. Die Analysen wurden von Herrn Dr. W. Schartau mit dem Aminosäureanalysator Liquimat III der Fa. Kontron im Pico-Puffer-System von Pierce durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Peakintegrators der Fa. Shimadzu (Modell Chromatopak E1A) oder durch Ausmessen der Peakflächen (Höhe x Halbwertsbreite). Die erhaltenen Werte wurden auf Eichläufe bezogen. Tryptophan und Cystein wurden nicht bestimmt.

11. Endgruppenbestimmung und Sequenzierung

a) Endgruppenbestimmung und manuelle Sequenzierung

Die Bestimmung der aminoterminalen Aminosäure und manuelle Sequenzierung von Proteinen oder Peptiden erfolgte mit dem DABITC-Reagenz (4-N,N-Dimethylaminoazobenzol-4'-isothiocyanat) nach der Methode von CHANG et al. (1978) mit folgenden Abweichungen: 1. Alle Inkubationen wurden bei 56°C durchgeführt. 2. Zur Konvertierung der Aminosäure-Thiazolinone in ihre Thiohydantoine wurde 50%ige (v/v) Trifluoressigsäure verwendet. In der Regel wurden für den Abbau 1-2 nMol Peptid eingesetzt. Bis zu 16 Peptide wurden bei zwei Abbauschritten pro Tag gleichzeitig abgebaut. Die DABTH-Aminosäuren wurden auf 2,5 x 2,5 cm großen Polyamidfolien (F-Micropolyamid) der Fa. Schleicher & Schüll identifiziert,

wobei zwischen den Aminosäuren Leucin und Isoleucin nicht unterschieden werden konnte. Da die Ausgangspeptide für Spaltungen reduziert und carboxymethyliert worden waren, wurde auf den Chromatogrammen an Stelle von DABTH-Cystein DABTH-Carboxymethyl-Cystein nachgewiesen.

b) Sequenzierung mit dem Festphasensequenator

Die automatische Sequenzierung von Peptiden wurde mit Hilfe eines von Herrn Dr. W. Schartau gebauten Festphasensequencators von Frl. F. Eyerle durchgeführt oder mit einem kommerziellen Festphasensequenator (Modell 4020 der Fa. LKB) von Herrn Prof. Dr. Salnikow an der Technischen Universität Berlin. Jeweils 10-20 nMol Peptid wurden dazu entweder an DITC-Glas (BRIDGEN, 1976) über Lysin gekoppelt oder an APG-Glas über die terminale Carboxylgruppe mit Hilfe von EDC (SALNIKOW et al., 1981) bzw. über das C-terminale Homoserin-Lacton bei Bromcyan-Peptiden. Der Abbau der Peptide wurde mit PITC oder mit DABITC/PITC (SALNIKOW et al., 1981) durchgeführt. Die PTH-Aminosäuren wurden durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie nachgewiesen (LOTTSPICH, 1980), die DABTH-Aminosäuren durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (SALNIKOW et al., 1981) und Chromatographie auf 2,5 x 2,5 cm-Polyamid-folien.

12. UV-Spektroskopie

Spektren im Bereich von 250-400 nm von 37 S-Hämocyanin und den Unter-einheiten wurden mit Spektralphotometern des Modells 118 der Fa. Cary und des Modells 320 der Fa. Perkin Elmer aufgenommen. Desoxygenierung wurde durch das Fehlen der 340 nm-Bande angezeigt (LOEWE und LINZEN, 1975).

13. Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Hämocyaninproben wurden nach Isolierung (Abschnitt III.1) gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, dialysiert und für den Meßbereich von 200-300 nm auf ca. 0,1 mg/ml, für den Meßbereich von 250-800 nm

auf ca. 1 mg/ml eingestellt.

Die Proben (Volumen: 3,3 ml) wurden unter Rühren oxygeniert durch Überleiten wasserdampf-gesättigter Luft. Die Desoxygenierung wurde für den 200-300 nm-Meßbereich durch 3stündiges Überleiten wasserdampf-gesättigten Argons unter Rühren durchgeführt. Für den 250-800 nm-Meßbereich wurde desoxygeniert durch Zufügen von 300 μ l 0,65 M NaHSO_3 in Tris/HCl, pH 8,0, zu 3 ml Probe (TAKESADA und HAMAGUCHI, 1968). Die vollständige Desoxygenierung war am Absorptionsspektrum erkennbar.

Die CD-Spektren wurden im Botanischen Institut der Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Scheer, mit einem Gerät der Fa. Jobin Yvon (Modell Dichrograph V) bei Raumtemperatur aufgenommen. Dabei wurde eine 0,1 cm-Küvette für den 200-300 nm-Bereich und eine 1 cm-Küvette für den 250-800 nm-Bereich verwendet. Die zylindrischen Küvetten wurden mit einem Plastikstopfen, Parafilm und Aluminiumfolie gasdicht verschlossen. Alle Spektren wurden in 1 nm-Schritten aufgenommen. Für den 200-300 nm-Meßbereich wurden jeweils 5 Scans durchgeführt. Aus den gespeicherten Einzelspektren konnten dann die endgültigen Spektren durch Mittelung mit Hilfe eines Computers bestimmt werden. Die Spektren wurden auf Magnetplatten (Disketten) gespeichert und nach Abzug des Referenzspektrums (Puffer mit bzw. ohne NaHSO_3) ausgedruckt. Der Spektrograph wurde mit Isoandrosteron nach der Bedienungsanleitung geeicht.

Die auf die mittlere Aminosäurerestmasse bezogene Elliptizität (θ_{NRW}) wurde nach $\theta = 3300 \times \Delta\epsilon$ berechnet, wobei $\Delta\epsilon$ die Differenz zwischen den Absorptionskoeffizienten des links- und rechts-polarisierten Lichts darstellt. Dabei wurde eine mittlere Aminosäurerestmasse von 116 zugrunde gelegt.

14. Computerisierte Chou/Fasman-Vorhersage der Sekundärstruktur

Sekundärstruktur-Vorhersagen aufgrund der bekannten Primärstruktur wurden mit Hilfe eines Computers im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried gemacht. Herr Dr. H. Deisenhofer, Abteilung für Strukturforschung, führte mich freundlicherweise in die Bedienung des Computers ein. Für die Vorhersage wurde ein Rechenprogramm verwendet, das von

K. NISHIKAWA (1983) in Anlehnung an CHOU und FASMAN (1978) erarbeitet wurde.

Da das Rechenprogramm auf Proteine beschränkt ist, die aus nicht mehr als 500 Aminosäuren bestehen, andererseits aber für die Vorhersage Fernwirkungen außer acht bleiben, wurden die Proteinsequenzen in zwei überlappende Abschnitte zerlegt, die aus je 400 Aminosäuren bestanden. Die Sequenz wurde jeweils in Richtung vom N-Terminus zum C-Terminus in den Computer eingegeben.

Bei den 10 Positionen der Untereinheit d, an denen nicht zwischen Leucin und Isoleucin unterschieden werden konnte, wurde die wahrscheinlichere Aminosäure eingegeben. In den Fällen, in denen bei der Untereinheit e an der entsprechenden Stelle im homologen Sequenzabschnitt ein Leucin oder Isoleucin vorkommt, wurde dieselbe Aminosäure als wahrscheinlicher angenommen. War die entsprechende Aminosäure im homologen Abschnitt eine andere als Leucin oder Isoleucin, so wurde entschieden aufgrund der Austauschhäufigkeiten entsprechender Aminosäure-Paare (bei denen zwischen Leucin und Isoleucin in der Untereinheit d unterschieden werden konnte) bei den Untereinheiten d und e und aufgrund einer Matrix der Mutationswahrscheinlichkeit (SCHULZ und SCHIRMER, 1979).

C. ERGEBNISSE

I. Untersuchungen zur Primärstruktur der Untereinheit d

1. Strategie der Sequenzanalyse

Die Untereinheit d des Hämocyanins von Eurypelma californicum hat eine relative Molekülmasse von ca. 73000, so daß die Sequenzanalyse sehr schwierig erschien, da in unserem Laboratorium kein automatischer Flüssigphasen-Sequenator zur Verfügung stand. Die Sequenz mußte daher vorwiegend manuell mit der DABITC-Methode ermittelt werden. Für eine manuelle Sequenzierung sollten die Peptide genügend klein und zugleich in ausreichender Menge vorhanden sein, um sie bis zum C-Terminus des Peptids abbauen zu können oder diesem nahe zu kommen.

Daher wurde im Prinzip folgende Sequenzierungs-Strategie angewandt: Die gesamte Polypeptidkette wurde entweder mit Bromcyan gespalten (SCHARTAU)* oder durch limitierte Trypsinolyse in zwei große Bruchstücke, d-Tn 34 und d-Tn 37. Durch enzymatische Spaltung dieser Bruchstücke mit Chymotrypsin (Ch), Staphylococcus aureus-Protease (SP) (SCHARTAU, EYERLE) oder Trypsin (T) wurden Peptide erhalten, die sich für eine manuelle Sequenzierung eigneten. Einige sehr nützliche überlappende Peptide wurden von SCHARTAU durch Spaltung mit Astacus-Protease (AP), die bevorzugt an kleinen aliphatischen Aminosäuren oder Hydroxy-Aminosäuren spaltet, erhalten. Die Zuordnung der Bromcyan-Peptide, die aus der Spaltung der Gesamtpolypeptidkette d hervorgingen (SCHARTAU), in eines der beiden großen Bruchstücke d-Tn 34 und d-Tn 37 aus der limitierten Trypsinolyse, wurde durch Bromcyan-Spaltung dieser Bruchstücke ermöglicht.

Für die Isolierung der kleinen Peptide erwies sich die Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie als die Methode der Wahl. Die Verwendung des farbigen DABITC-Reagenz zur Sequenzanalyse ermöglichte noch 1-2 nMol eines Peptids zu sequenzieren.

* Die Gesamtstruktur der Untereinheit d wurde in gemeinsamer Arbeit durch Herrn Dr. W. Schartau mit seinen technischen Assistentinnen Frau W. Geisert, bzw. Frau H. Storz, meiner Kondaktorandin F. Eyerle und mir aufgeklärt. Ich werde auf die Beiträge der anderen Bearbeiter jeweils hinweisen.

2. Anfangssequenz der Untereinheit d

Frühere Untersuchungen über die N-Termini der Untereinheiten von Hämocyanin der Vogelspinne Eurypelma californicum ergaben mit verschiedenen Methoden (konventioneller Edman-Abbau, Dansylierung, DABITC-Abbau) Prolin als N-terminale Aminosäure bei den Untereinheiten b und c, wogegen bei den übrigen Untereinheiten die N-terminalen Aminosäuren nicht bestimmt werden konnten, was eine Blockierung der N-terminalen Aminosäuren als möglich erscheinen ließ (MARKL et al., 1979). Eine Blockierung würde das Ansequenzieren eines Proteins oder Peptids unmöglich machen.

Für einen erneuten Versuch, die Untereinheit d mit der DABITC-Methode anzusequenzieren, wurde denaturierte und carboxymethylierte Untereinheit d verwendet. Eine Blockierung konnte nicht festgestellt werden. Die folgende N-terminale Sequenz wurde ermittelt:

H₂N-Thr-Ile*-Ala-Asp-His-Gln-Ala-.

3. Trennung von d-Tn 34 und d-Tn 37

SCHARTAU et al. (1981) hatten die UE d durch limitierte Trypsinolyse mit nachfolgender Spaltung von Disulfidbrücken (Mercaptolyse und SH-Gruppen-Alkylierung) in zwei große Bruchstücke zerlegt. Durch SDS-Gelelektrophorese war diesen Bruchstücken eine relative Molekülmasse von 34000 (d-Tn 34) und 37000 (d-Tn 37) zugeordnet worden. EYERLE (1980) konnte diese Bruchstücke mit dem Anionenaustauscher DEAE-Sephacel in alkalischem Puffer, 8 M an Harnstoff, trennen. Da dies aber zu einer möglichen N-terminalen Blockierung der Untereinheiten durch Cyanatbildung aus Harnstoff im alkalischen Milieu führen könnte, wurde nach einem geeigneten Kationenaustauscher gesucht, um die Trennung im sauren Milieu durchführen zu können.

* Das verwendete Chromatographiesystem bei der manuellen DABITC-Sequenzierung ließ eine Unterscheidung zwischen den Aminosäuren Leucin und Isoleucin nicht zu. Meistens gelang dies nur durch die kombinierte Auswertung der AS-Analysen von Peptiden aus Nachspaltungen und/oder Überlappungspeptiden. Dazu wurden auch Peptide herangezogen, die nicht im Rahmen dieser Arbeit isoliert worden waren.

Für die Trennung des Spaltgemisches erwies sich von den untersuchten Trennsystemen der Kationenaustauscher CM-Sephacryl CL-6B (Pharmacia) bei Verwendung eines 0,05 M Natriumacetat-Puffers, 8 M Harnstoff, pH 4,5, am günstigsten. Durch Anlegen eines NaCl-Gradienten (0 - 0,3 M) konnten beide Bruchstücke getrennt werden (Abb. 1). Auf die vorherige Abtrennung ungespaltener UE d (ca. 10 %) durch Gelfiltration über Sephacryl S-300 superfine konnte nicht verzichtet werden, da die UE d zusammen mit dem Bruchstück d-Tn 34 eluiert wird. Die Ausbeute an d-Tn 37 betrug ca. 80 %, d-Tn 34 neigte jedoch dazu, irreversibel an den Ionenaustauscher zu binden, so daß die Ausbeute oft nur 40 % betrug. Auch eine hohe Konzentration von NaCl (2 M) konnte das Protein nicht mehr ablösen. Bei einer typischen Präparation, ausgehend von 200 mg HC, wurden 30 mg der UE d erhalten, woraus nach limitierter Proteolyse ca. 6 mg d-Tn 34 und 12 mg d-Tn 37 erhalten wurden.

Die Aminosäure-Zusammensetzung von d-Tn 34 und d-Tn 37 zeigte, daß die Aminosäuren Methionin, Lysin und Arginin zwischen den zwei großen Bruchstücken annähernd gleich verteilt sind (SCHARTAU et al., 1981). Der Vergleich der N-terminalen Sequenzen mit der Anfangssequenz der UE d zeigte, daß d-Tn 34 das N-terminale und d-Tn 37 das C-terminale Bruchstück der UE d ist (siehe Abschnitte I.4.c und I.5.c).

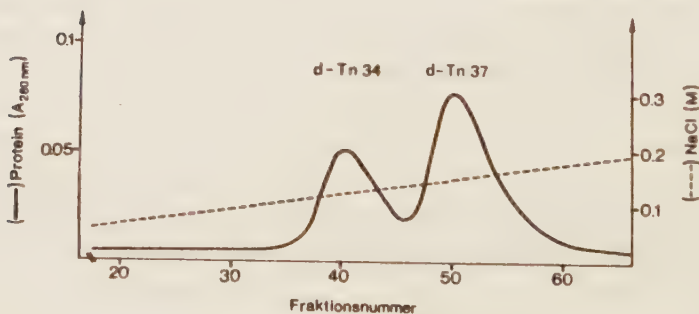


Abb. 1

Trennung der Bruchstücke d-Tn 34 und d-Tn 37 aus der limitierten Trypsinolyse der UE d über CM-Sephacryl CL-6B.

Säule: 1,5 x 15 cm; Elutionsmittel: 0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, 8 M Harnstoff; Gradient: 0 - 0,3 M NaCl (300 + 300 ml); Flußrate: 6 ml/h; 3 ml-Fraktionen.

4. Peptide aus d-Tn 34

a) Bromcyan-Spaltung von d-Tn 34

Bromcyan spaltet Peptide und Proteine C-terminal von Methionin (Met-X). Die Aminosäure-Analyse des Bruchstücks d-Tn 34 ließ auf 7 Methioninreste schließen (SCHARTAU et al., 1981). Es konnten daher 8 Peptide nach Bromcyan-Spaltung erwartet werden.

Günstige Spaltbedingungen (Zeit- und Temperaturabhängigkeit) wurden durch Vorversuche von DURST (1981) ermittelt. 10 mg d-Tn 34 (reduziert und carboxymethyliert) wurden mit Bromcyan 24 Stunden bei Raumtemperatur gespalten, das lyophilisierte Spaltgemisch in 1 ml eines Gemisches von 0,2 N Essigsäure und 70 % Ameisensäure (7:3) gelöst und durch Gelfiltration über Sephadex G-25 superfine (1,5 x 100 cm) mit 0,2 N Essigsäure als Elutionsmittel vorgetrennt. Das Elutionsprofil zeigte einen großen Gipfel (I), vier deutliche kleinere Gipfel (II, III, V und VI) und einen ansteigenden Bereich (IV), der ohne deutlichen Absatz in Gipfel V übergeht (Abb. 2).

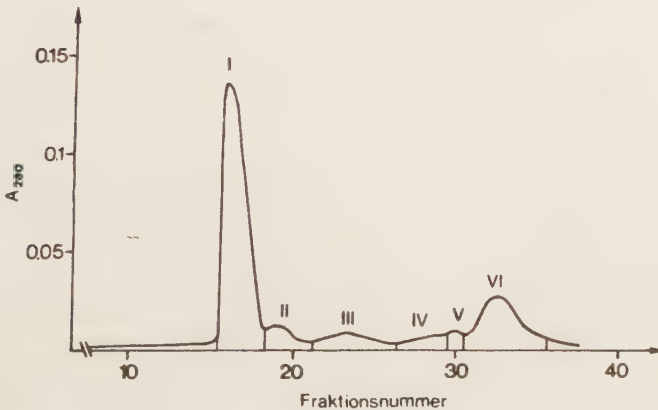


Abb. 2:

Vortrennung der BrCN-Peptide aus d-Tn 34 über Sephadex G-25 superfine.

Säule: 1,5 x 100 cm; Elutionsmittel: 0,2 N Essigsäure; Durchflußgeschwindigkeit: 4 ml/h, 60 Min.-Fraktionen. Die Bereiche II-VI wurden der HPLC unterworfen.

Die jeweiligen Fraktionen der Bereiche I - VI wurden vereinigt. Der Bereich I enthielt vermutlich die großen Peptide 34-CB 1, 34-CB 2, 34-CB 7 und möglicherweise größere unvollständig gespaltene BrCN-Peptide, die noch ein oder mehrere Methionine enthalten. Dafür spricht eine Proteinbande im SDS-Gel mit einer relativen Molekülmasse von ca. 23000. Die entsprechende AS-Analyse zeigte, daß dieses Peptid neben Homoserin und Homoserin-Lacton noch Methionin enthält (DURST, 1981). Auf die Isolierung der großen Peptide 34-CB 1, 34-CB 2 und 34-CB 7 wurde verzichtet, da diese auch durch BrCN-Spaltung der UE d gewonnen wurden (SCHARTAU) und in die Gesamtsequenz eingeordnet werden konnten.

Die Peptide aus den Bereichen II - VI der Gelfiltration wurden in je 200 µl 0,05 M Ammoniumacetat, 10%ig an Ameisensäure, aufgenommen und durch HPLC mit dem Acetat-System (KRATZJN et al., 1980) getrennt. Der Bereich II enthielt nur das Peptid 34-CB 5. Dennoch zeigte das Elutionsprofil zwei Gipfel (Abb. 3), was damit erklärt werden kann, daß das Peptid zu etwa gleichen Teilen in der Homoserin- und der Homoserin-Lacton-Form eluiert wurde. Der Bereich III enthielt die drei Peptide 34-CB 4, 34-CB 6 und 34-CB 8 (Abb. 4). Aus den Bereichen IV, V und VI konnten durch HPLC keine Peptide isoliert werden. Der Gipfel VI der Gelfiltration kann vermutlich auf Ameisensäure, die in der aufgetragenen Proben enthalten war, zurückgeführt werden.

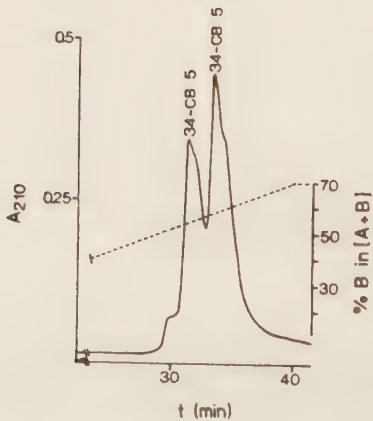


Abb. 3:

HPLC des Peptids 34-CB 5 aus dem Bereich II der Gelfiltration (Abb. 2).

Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System, Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptid wurde in 200 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen. Je Lauf wurden 100 µl auf die Säule aufgetragen. Die beiden Gipfel beruhen wohl darauf, daß das Peptid in der Homoserin- und Homoserin-Lacton-Form eluiert wurde.

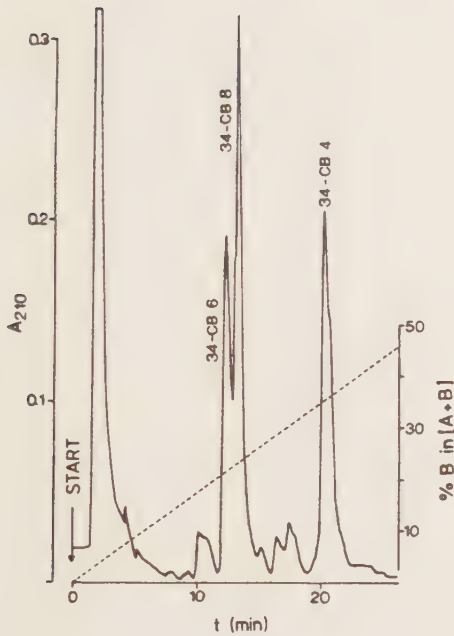


Abb. 4:
HPLC der 34-CB-Peptide aus Bereich
III der Gelfiltration (Abb. 2).
Trennbedingungen wie unter Abb. 3
beschrieben.

Bei den isolierten 34-CB-Peptiden wurden folgende Anfangssequenzen gefunden:

34-CB 4 (Pos. 205-220)*:

Cys-Ala-Arg-Tyr-Asp-Cys-Glu-Arg-Leu-

34-CB 5 (Pos. 221-253):

Leu-Pro-Phe-Gln-Asn-Ile-Asp-Asp-Glu-Leu-Glu-Gly-Tyr-Ser-Pro-His-Leu-

34-CB 6 (Pos. 254-265):

His-Leu-Arg-Asp-Ile-Asn-Asp-Cys-

34-CB 8 (Pos. 327-336):

Ile-Ala-Arg-Ile-His-Asp-Ala-Asp-

* Die Positionsnummern geben die Lage der Peptide in der Gesamtsequenz (Abb. 30) an.

Neben BrCN-Peptiden können bei der BrCN-Spaltung auch Peptide durch Säurespaltung entstehen, da diese meist in 70%iger Ameisensäure durchgeführt wird. Wie die AS-Analysen zeigten, enthielten aber die Peptide 34-CB 4 (Pos. 205-220), 34-CB 5 (Pos. 221-253) und 34-CB 6 (Pos. 254-265) Homoserin und/oder Homoserin-Lacton, die bei der BrCN-Spaltung aus Methionin entstehen (Tab. 1). Dies kennzeichnet diese Peptide eindeutig als BrCN-Peptide. Sie konnten manuell so weit abgebaut werden, daß eine eindeutige Zuordnung zu den entsprechenden BrCN-Peptiden, die nach Spaltung der gesamten UE d isoliert wurden (SCHARTAU), möglich war. So konnten zu Beginn der Sequenzaufklärung, als die Sequenzen der notwendigen Überlappungspeptide noch nicht vorlagen, die oben genannten drei BrCN-Peptide dem Bruchstück d-Tn 34 zugeordnet werden.

Das Peptid 34-CB 4 ist das Überlappungspeptid der tryptischen Peptide 34-T 21 (auch des nicht erwarteten Peptids 34-T-Y 1), 34-T 22, 34-T 23 und 34-T 24, wobei die Überlappung zwischen 34-T 23 und 34-T 24 nur eine Aminosäure beträgt.

Das Peptid 34-CB 5 konnte nach Kopplung über das C-terminale Homoserin-Lacton an APG-Glas von Herrn Prof. Dr. Salnikow, Technische Universität Berlin, 17 Schritte abgebaut werden. Die durch manuellen Abbau erhaltene Sequenz wurde dadurch bestätigt und um 9 Schritte verlängert.

Das Peptid 34-CB 6 überlappt die beiden tryptischen Peptide 34-T 25 und 34-T 26.

Aus der AS-Analyse des Peptids 34-CB 8 (Pos. 327-336) ging hervor, daß dieses kein Homoserin/Homoserin-Lacton enthält (Tab. 1). Das bedeutet, daß das Ausgangspeptid kein Methionin enthielt. Daraus und aus der Tatsache, daß dieses Peptid zwar in der Anfangssequenz mit dem Peptid CB 8 (aus der Spaltung der gesamten UE d hervorgegangen) übereinstimmt, das Peptid CB 8 aber um 8 Aminosäuren länger ist (Abschnitt C.I.4.b) und die beiden großen Fragmente aus der limitierten Trypsinolyse der nativen UE d verbindet, muß man folgern, daß es sich hier um das C-terminale BrCN-Peptid von d-Tn 34 handelt.

Tab. 1:

Aminosäure-Zusammensetzung der aus d-Tn 34 isolierten Bromcyan-Peptide.
Die Werte, die auf 24stündiger Hydrolyse beruhen, wurden nicht im Hinblick auf Zerstörung der Aminosäuren oder unvollständige Hydrolyse extrapoliert. Der Methionin-Gehalt in den Peptiden wurde aus den Homoserin/Homoserin-Lacton-Werten erschlossen. Cystein und Tryptophan wurden nicht bestimmt. Die Anzahl der Aminosäuren in den Peptiden, die beim schrittweisen Abbau erfaßt wurde, ist in Klammern angegeben.

Peptid	34-CB 4	34-CB 5	34-CB 6	34-CB 8
Pos.	205-220	221-253	254-265	327-336
Asx	1,3 (1)	3,4 (3)	3,2 (3)	2,4 (2)
Thr				
Ser	0,8 (1)	5,3 (6)	0,9 (1)	
Glx	2,3 (2)	3,6 (3)	0,9 (1)	
Pro		2,5 (3)		
Gly	1,6 (1)	3,9 (4)		1,4 (1)
Ala	1,2 (1)	1,1 (1)		1,9 (2)
Val	0,8 (1)	1,2 (1)	1,0 (1)	
Met	0,5 (1)	0,9 (1)	0,8 (1)	
Ile		1,0 (1)	1,0 (1)	1,8 (2)
Leu	1,7 (2)	4,6 (5)	0,9 (1)	
Tyr	0,6 (1)	1,3 (2)		
Phe		1,1 (1)		
Lys				
His		0,9 (1)	0,7 (1)	0,8 (1)
Arg	2,5 (3)	1,3 (1)	0,8 (1)	1,7 (2)

b) Nachspaltung des Peptids 34-CB 8

Das Peptid 34-CB 8 aus der BrCN-Spaltung von d-Tn 34 wurde mit Trypsin gespalten. Das Spaltgemisch wurde der HPLC bei Verwendung des Acetat-Systems unterworfen. Es zeigte sich jedoch, daß dem Gipfel mit einer Retentionszeit von 7,4 Min. zwei Peptide, 34-CB 8-T 1 und 34-CB 8-T 2, zugeordnet werden mußten (Abb. 5). Weitere Peptide konnten aus dem Spaltgemisch nicht isoliert werden.

Im Abschnitt C.I.4.a wurde gezeigt, daß es sich bei dem BrCN-Peptid 34-CB 8 vermutlich um das C-terminale Peptid im d-Tn 34 handelt. Es sollte sich daher unter seinen Spaltprodukten kein Peptid finden lassen, das C-terminal mit Methionin bzw. mit Homoserin/Homoserin-Lacton endet oder in CB 8 (aus UE d isoliert) zu finden ist, nicht aber in 34-CB 8. Beim manuellen DABITC-Abbau von 34-CB 8-T 1 und 34-CB-8-T 2

konnten im zweiten und dritten Schritt zwei DABTH-Aminosäuren auf den Chromatogrammen nachgewiesen werden, die sich allerdings in ihrer Intensität deutlich unterschieden. Ab dem vierten Schritt war wiederum nur noch eine DABTH-Aminosäure erkennbar. So konnten die Sequenzen der zwei Peptide trotz ihrer gemeinsamen Elution in der HPLC bis zu ihren C-Termini erschlossen werden:

34-CB 8-T 1 (Pos. 327-329):

Ile-Ala-Arg

34-CB 8-T 2 (Pos. 330-336):

Ile-His-Asp-Ala-Asp-Gly-Arg

Die AS-Analyse des Peptidgemisches entsprach, wie zu erwarten, der Summe beider Peptide (Tab. 2).

Neben der Absicherung, daß es sich bei dem Peptid 34-CB 8 um das C-terminale BrCN-Peptid im d-Tn 34 handelt, ermöglichte die Nachspaltung mit Trypsin die Sequenz des Peptids 34-CB 8 bis zum C-Terminus aufzuklären. Zugleich ist damit klar, daß die native UE d bei limitierter Trypsinolyse C-terminal von einem Arginin-Rest (Arg-X) gespalten wird.

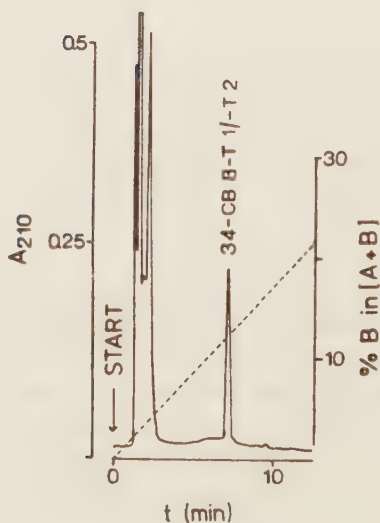


Abb. 5:

HPLC der tryptischen Peptide aus der Nachspaltung von 34-CB 8.
Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-system; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 200 µl Startpuffer, 10 % Ameisensäure, aufgenommen und in zwei aliquoten Mengen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

Asx	2,2	(2)
Thr		
Ser		
Glx		
Pro		
Gly	1,0	(1)
Ala	1,8	(2)
Val		
Met		
Ile	1,9	(2)
Leu		
Tyr		
Phe		
Lys		
His	1,0	(1)
Arg	1,9	(2)
Σ AS	9,8	(10)

Tab. 2:

AS-Zusammensetzung des Peptidgemisches 34-CB 8-T 1 und 34-CB 8-T 2.

Die Dauer der Hydrolyse betrug 24 Stunden. Es wurde nicht auf Zerstörung von Aminosäuren oder unvollständige Hydrolyse extrapoliert. Die Anzahl der Aminosäuren, die sich aus dem Sequenzabbau ergab, ist in Klammern angegeben.

c) Trypsin-Spaltung von d-Tn 34

Im Bruchstück d-Tn 34 (aus der limitierten Trypsinolyse der UE d) waren aufgrund der AS-Analyse 9 Lysin- und 19 Argininreste zu erwarten (SCHARTAU et al., 1981). Durch Spaltung mit Trypsin, das C-terminal von den Aminosäureresten Lysin und Arginin spaltet (Lys-X, Arg-X), sollten daher 25-30 kleinere Peptide entstehen, die sich durch HPLC leicht isolieren lassen sollten.

10 mg d-Tn 34 wurden mit Trypsin gespalten und das entstandene Spaltgemisch nach Lyophilisation über HPLC bei Verwendung des Acetat-Systems getrennt (Abb. 6). Die Bestimmung der N-Termini mit einer kleinen aliquoten Menge der Gipfelfraktionen zeigte, daß schon nach diesem ersten Reinigungsschritt die meisten Peptide rein erhalten werden konnten. Einige Peptide wurden gemeinsam oder nicht genügend weit voneinander getrennt eluiert (34-T 10 und 34-T 23, 34-T 2 und 34-T 18, 34-T 9 und 34-T 21). Diese Peptide konnten dann im TFA-System über eine Vydac-HPLC-Säule getrennt werden (Abb. 7 a-c). Ein Gipfel aus dem Acetat-System (Abb. 6) enthielt Peptid 34-T 5 und das aus einer unspezifischen Spaltung hervorgegangene Peptid 34-T-S 1. In diesem Fall war aber eine Nachreinigung nicht notwendig, da beide Peptide

in deutlich unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorlagen, so daß bei der manuellen Sequenzierung die Zuordnung der entsprechenden Aminosäuren auf den Chromatogrammen zum jeweiligen Peptid leicht möglich war. Außerdem enthielt die benachbarte Fraktion (Abb. 6) das Peptid 34-T 5 auch noch in reiner Form, so daß durch Subtraktion der entsprechenden Aminosäuren von Peptid 34-T 5 die Sequenz des Peptids 34-T-S 1 eindeutig bestimmt werden konnte.

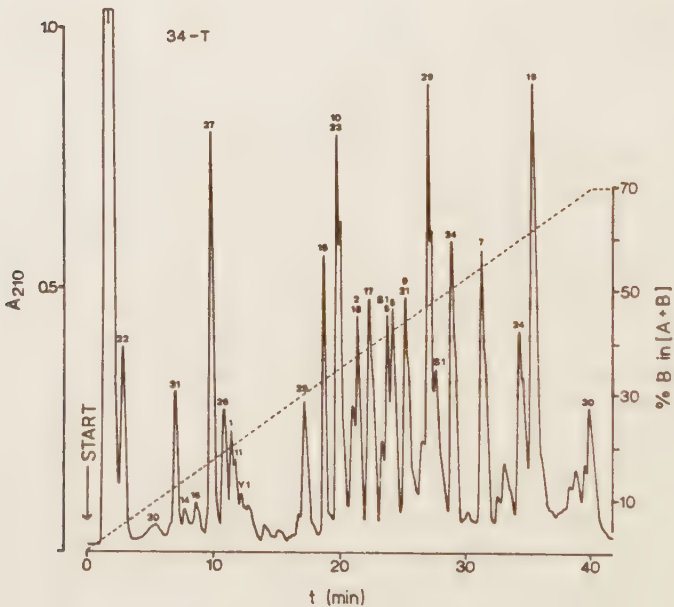


Abb. 6:

HPLC der tryptischen Peptide aus d-Trp 34.

Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 500 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 :1) aufgenommen und in 5 Portionen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

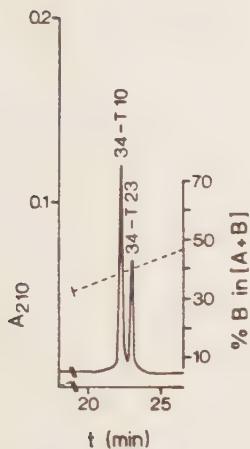


Abb. 7 a

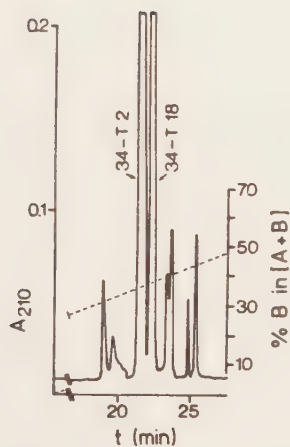


Abb. 7 b

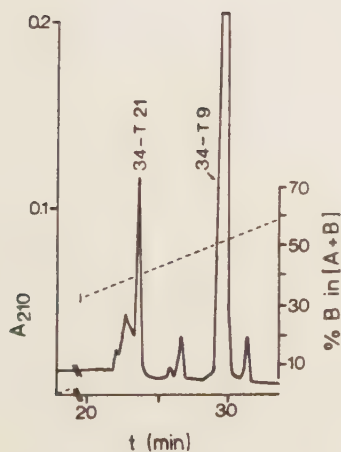


Abb. 7 c

Abb. 7 a-c:

HPLC zur Trennung von Peptidpaaren, die im Acetat-System in einer Gipfel-fraktion enthalten waren: a) 34-T 10/34-T 23, b) 34-T 2/34-T 18, c) 34-T 9/34-T 21.

Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 Min. Die Peptidgemische wurden in 100 µl 0,1 % TFA aufgenommen und auf die Säule aufgetragen.

Bei den aus d-Tn 34 (nicht am Ionenaustauscher gebunden) isolierten tryptischen Peptiden wurden folgende Sequenzen gefunden:

34-T 1 (Pos. 1-8):

Thr-Ile-Ala-Asp-His-Gln-Ala-Arg

34-T 2 (Pos. 15-32):

Lys-Leu-Thr-Ser-Leu-Ser-Pro-Asp-Pro-Leu-Pro-Glu-Ala-Glu-Arg-Asp-Pro-Arg

34-T 5 (Pos. 35-41):

Gly-Val-Gly-Phe-Leu-Pro-Arg

34-T 7 (Pos. 68-80):

Asn-Phe-Asp-Asp-Phe-Leu-Ala-Leu-Ala-Thr-Asn-Ala-Arg

34-T 9 (Pos. 100-117):

Asp-Asp-Cys-Asn-Gly-Val-Val-Ile*-Pro-Pro-Ile*-Gln-Glu-Val-Phe-Pro-Asp-Arg

34-T 10 (Pos. 118-126):

Phe-Val-Pro-Ala-Glu-Thr-Ile-Asn-Arg

34-T 11 (Pos. 127-132):

Ala-Leu-Lys-Val-Asp-Lys

34-T 14 (Pos. 133-138):

Ile-Ser-Asp-Pro-Asn-

34-T 15 (Pos. 133-146):

Ile-Ser-Asp-Pro-Asn-Lys-Asp-Thr-Val-Val-Pro-Ile-Gln-

34-T 16 (Pos. 147-151):

Thr-Gly-Asn-Ile-Arg

34-T 17 (Pos. 147-161):

Thr-Gly-Asn-Ile-Arg-Asp-Pro-Glu-Tyr-Asn-Val-Ala-Tyr-Phe-Arg

* Bei den mit einem Stern gekennzeichneten Aminosäuren Leucin bzw. Isoleucin könnte es sich auch um Isoleucin bzw. Leucin handeln. In diesem und den folgenden Fällen wurde aufgrund des Sequenzvergleichs mit der UE e und einer Matrix der Mutationswahrscheinlichkeit (SCHULZ und SCHIRMER, 1979) entschieden.

34-T 18 (Pos. 152-161):

Asp-Pro-Glu-Tyr-Asn-Val-Ala-Tyr-Phe-Arg

34-T 19 (Pos. 162-188):

Glu-Asp-Ile*-Gly-Ile*-Asn-Ser-His-His-Trp-His-Trp-His-Leu-Val-Tyr-Pro-
-Ala-

34-T 20 (Pos. 189-192):

Ile-Lys-Asp-Arg

34-T 21 (Pos. 193-207):

Lys-Gly-Glu-Leu-Phe-Tyr-Tyr-Met-His-Gln-Gln-Met-

34-T 22 (Pos. 208-212):

Tyr-Asp-Cys-Glu-Arg

34-T 23 (Pos. 213-219):

Leu-Ser-Val-Gly-Leu-Gln-Arg

34-T 24 (Pos. 220-249):

Met-Leu-Pro-Phe-Gln-Asn-Ile-Asp-Asp-Glu-Leu-(Glu)*-Gly-Tyr-

34-T 25 (Pos. 250-256):

Pro-Ala-Gly-Met-His-Leu-Arg

34-T 26 (Pos. 257-267):

Asp-Ile-Asn-Asp-Cys-Ser-Val-Gln-Met-Glu-Arg

34-T 27 (Pos. 268-269):

Trp-Arg

34-T 29 (Pos. 272-287):

Ile-Leu-Asp-Ala-Ile-His-Thr-Gly-Leu-Val-Thr-Asp-Ser-His-Gly-

34-T 30 (Pos. 291-329):

Leu*-Thr-Glu-

34-T 31 (Pos. 330-336):

Ile-His-Asp-Ala-Asp-Gly-Arg

34-T-Y 1 (Pos. 200-207):

Met-His-Gln-Gln-Met-Cys-Ala-Arg

34-T-S 1 (Pos. 239-249):

Ser-Leu-Val-Ser-Gly-Leu-Ser-Tyr-Gly-Ser-Arg

Nach vollständiger Aufklärung der Sequenz der UE d konnte die wirkliche Anzahl der Lysinreste in dem Bruchstück d-Tn 34 zu 14 bestimmt werden, die der Argininreste zu 21. 36 Peptide sollten daher isolierbar sein. Demgegenüber wurden 24 echte tryptische Peptide gefunden (vgl. Abschnitt C.I.6.b), und zusätzlich 2 Peptide, bei denen die Spaltung nach Tyrosin (Tyr-X) bzw. nach Serin (Ser-X) erfolgt war. Ein großer Teil der tryptischen Peptide, die C-terminal mit der Aminosäure Arginin endeten, konnten bis zum Arginin einschließlich sequenziert werden, was wohl auf den hydrophilen Charakter dieser Aminosäure zurückzuführen ist. Diese Peptide wurden daher nicht vorzeitig aus der wässrigen, das Restpeptid enthaltenden Phase, extrahiert. Bei den C-terminal mit Lysin endenden Peptiden gelang eine vollständige Sequenzierung meistens nicht. 75 % der gesamten Sequenz von d-Tn 34 konnte durch die gefundenen Sequenzen abgedeckt werden. Ein großer Teil der Peptide konnte zu Beginn der Sequenzaufklärung aufgrund mehr oder weniger deutlicher Homologien zur UE e (SCHNEIDER et al., 1983) eingeordnet werden. Im folgenden sollen die Peptide im Hinblick auf ihren Beitrag zur Aufklärung der Gesamtsequenz und auf strukturelle Besonderheiten besprochen werden.

Das Peptid 34-T 1 (Pos. 1-8) stellt das N-terminale Peptid dar. Die Anfangssequenz der UE d konnte so um die Aminosäure Arginin verlängert und zugleich abgesichert werden.

34-T 2 (Pos. 15-32) beginnt mit der Aminosäure Lysin. Möglicherweise kann, wenn zuerst zwischen Lys(14) und Lys(15) gespalten wird, das eine N-terminale Lys(15) vom Enzym nicht mehr abgespalten werden. Zwischen Arg(29) und Asp(30) erfolgte ebenfalls keine Spaltung, möglicherweise noch durch den Einfluß des Pro(31). Arg-Pro- und Lys-Pro-Bindungen werden nämlich nicht oder nur langsam gespalten. Das Peptid 34-T 2 überlappt mit dem Peptid 34-SP 1.

Bei 34-T 7 (Pos. 68-80) war allein aufgrund der AS-Analyse nicht klar, ob dieses Peptid tatsächlich schon mit der Aminosäure Arg(80) endet. Durch Nachspaltung mit Chymotrypsin (siehe Abschnitt C.I.4.d)

konnte dies geklärt werden.

34-T 9 (Pos. 100-117) deckt allein den Sequenzbereich von Ile(107) bis Glu(112) ab. Es stellt die Überlappung zu 34-SP 3 dar.

34-T 10 (Pos. 118-126) überlappt die beiden Peptide 34-SP 3 und 34-SP 4. In dem Sequenzbereich von Ala(127) bis Lys(146) wurden durch unvollständige Spaltungen nach den Lysinresten die Peptide 34-T 11 (Pos. 127-132), in dem nach Lys(129) nicht gespalten wurde, und 34-T 15 (Pos. 133-146), in dem nach Lys(138) nicht gespalten wurde, generiert (siehe auch Abschnitt C.I.6.b). Die Länge des Peptids 34-T 15 wurde zunächst aufgrund der AS-Analyse überschätzt. Das Peptid war deshalb nach Kopplung an DITC-Glas im Festphasensequenzator von SALNIKOW abgebaut worden. Dabei bleibt die erste Aminosäure über ihre Aminogruppe kovalent am Glas gebunden und konnte deshalb nicht identifiziert werden. Die manuell erhaltene Sequenz wurde bestätigt.

Die Peptide 34-T 16 (Pos. 147-151) und 34-T 18 (Pos. 152-161) sind in Peptid 34-T 17 (Pos. 147-161) enthalten, in dem zwischen Arg(151) und Asp(152) keine Spaltung stattfand. 34-T 17 bzw. 34-T 18 überlappen mit 34-CB 2-SP 1.

Peptid 34-T 19 (Pos. 162-188) wurde manuell bis Ala(179) abgebaut. Nach Kopplung an DITC-Glas wurde das Peptid von SALNIKOW bis AS(177) abgebaut, wobei die N-terminale Glu(162) aufgrund des Kopplungsmechanismus nicht identifiziert werden konnte. Das Peptid enthält die Sequenz -His-His-Trp-His-Trp-His-, die an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt ist. Sowohl bei der manuellen als auch bei der automatischen Sequenzierung wurden die beiden Tryptophanreste Trp(171) und Trp(173) nicht nachgewiesen, da sie vermutlich oxidativ zerstört wurden. Aufgrund des hohen Homologiegrades mit anderen Cheliceraten-Hämocyaninen (SCHNEIDER et al., 1982; NEMOTO und TAKAGI, 1983; YOKOTA et al., 1983) bestand jedoch kein Zweifel an ihrer Existenz. Später konnten von SCHARTAU durch AS-Analyse, wobei zur Hydrolyse Thioglycolsäure als Schutzreagenz zugesetzt wurde, tatsächlich 2 Tryptophanreste nachgewiesen werden. Darüber hinaus war von SCHARTAU bei der Isolierung von BrCN-Peptiden aus der UE d ein Peptid gefunden worden (34-CB-W 1), das mit His(174) begann und auf eine Reaktion von Bromcyan mit Trp(173) zurückgeführt werden muß.

Im Bereich eines Clusters von basischen Aminosäuren (3 Lysin, 1 Arginin) liegen das Peptid 34-T 20 (Pos. 189-192) und der Beginn des Peptids

34-T 21 (Pos. 193-207). Bei 34-T 20 fand keine Spaltung zwischen Lys(190) und Asp(191) statt. 34-T 21 dagegen beginnt mit Lysin, das offensichtlich als einzelne N-terminale Aminosäure nicht abgespalten wird (vgl. 34-T 2). Die auf den Chromatogrammen relativ schwer identifizierbare Aminosäure Lysin konnte eindeutig durch AS-Analyse nachgewiesen werden. 34-T 21 bzw. 34-T-Y 1 (siehe unten) überlappt die beiden BrCN-Peptide 34-CB 3 und 34-CB 4.

Zwischen den Aminosäuren Tyr(199) und Met(200) erfolgte eine nicht Trypsin-spezifische Spaltung, aus der das Peptid 34-T-Y 1 (Pos. 200-207) hervorging. Dieses Peptid ermöglichte es, die Sequenz bei 34-T 21 bis zum C-terminalen Arginin zu ergänzen.

34-T 23 (Pos. 213-219) ermöglichte die Sequenz des BrCN-Peptids 34-CB 4, das nur bis Pos. 213 abgebaut werden konnte, bis zur vorletzten Aminosäure, Arg(219), zu verlängern.

34-T 24 (Pos. 220-249) wurde manuell und automatisch (SALNIKOW) nach EDC-Kopplung abgebaut. Der automatische Abbau ermöglichte die Sequenz um 4 Schritte zu verlängern, wobei allerdings Glu(231) nicht nachgewiesen werden konnte. Zwischen Ser(238) und Ser(239) fand eine nicht erwartete Trypsin-Spaltung statt, wodurch das Peptid 34-T-S 1 (Pos. 239-249) entstand. Mit seiner Hilfe gelang es, das Peptid 34-T 24 nach einer Lücke von 5 Aminosäuren bis zum C-Terminus zu sequenzieren. Bemerkenswert ist der hohe Serin-Gehalt von 34-T 24.

Durch 34-T 25 (Pos. 250-256) werden die beiden BrCN-Peptide 34-CB 5 und 34-CB 6 verbunden.

34-T 26 (Pos. 257-267) überlappt die BrCN-Peptide 34-CB 6 und 34-CB 7, wobei die Überlappung mit 34-CB 7 allerdings nur 2 Aminosäuren beträgt.

34-T 27 (Pos. 268-269) ist das kürzeste tryptische Peptid in d-Tn 34, das isoliert werden konnte.

34-T 29 (Pos. 272-287) wurde manuell und automatisch nach DITC-Kopplung (SALNIKOW) abgebaut, wobei der manuelle Abbau um 3 Schritte weiter bis zur vorletzten Aminosäure erfolgte. Die C-terminale Aminosäure Lysin ergab sich aus der AS-Analyse.

34-T 30 (Pos. 291-329) ist das größte tryptische Peptid, das isoliert wurde. Es enthält neben dem C-terminalen Arg(329) noch ein Lysin, an dem aber offenbar wegen des nachfolgenden Pro(314) keine Spaltung stattfand. 34-T 30 wurde vom N-Terminus her nur 3 Schritte abgebaut, da ein großer Teil der Sequenz des Peptids durch Nachspaltung mit

Tab. 3:

Aminosäurezusammensetzung der aus d-In 34 isolierten tryptischen Peptide.

Die Werte, die auf 26stündiger Hydrolyse beruhen, wurden nicht im Hinblick auf Zerstörung der Aminosäuren oder unvollständige Hydrolyse extrapoliert. Cystein und Tryptophan wurden nicht bestimmt. Die Anzahl der Aminosäuren in den Peptiden, die beim schrittweisen Abbau erfagt wurde, ist in Klammern angegeben.

Peptid	34-I 1	34-I 2	34-I 5	34-I 7	34-I 9	34-I 10	34-I 11	34-I 14	34-I 15	34-I 16	34-I 17	34-I 18
Pos.	1-8	15-32	35-41	68-80	100-117	118-126	127-132	133-138	133-146	147-151	147-161	152-161
Asx	1,4 (1)	2,3 (2)		3,1 (4)	5,1 (4)	1,1 (1)	1,2 (1)	2,2 (2)	3,4 (3)	1,1 (1)	2,9 (3)	2,4 (2)
Thr	0,7 (1)	1,3 (1)		0,8 (1)		1,0 (1)			1,2 (1)	0,9 (1)	0,7 (1)	
Ser		2,3 (2)						1,2 (1)	1,3 (1)			
Glx	1,1 (1)	2,2 (2)			2,1 (2)	1,1 (1)			1,4 (1)		1,2 (1)	1,3 (1)
Pro		3,7 (4)	1,4 (1)		2,9 (3)	0,8 (1)			1,8 (2)		0,7 (1)	0,6 (1)
Gly			1,7 (2)		1,4 (1)			0,6 (1)		1,1 (1)	1,6 (1)	
Ala	1,7 (2)	0,9 (1)		2,1 (3)		1,0 (1)	1,3 (1)				0,9 (1)	1,2 (1)
Val			0,8 (1)		2,4 (3)	0,9 (1)	0,8 (1)		2,2 (2)		0,7 (1)	0,9 (1)
Met												
Ile	0,8 (1)				1,3 (1)	0,5 (1)		1,1 (1)	1,9 (2)	1,1 (1)	0,5 (1)	
Leu		2,9 (3)	0,8 (1)	2,8 (2)	0,8 (1)		0,9 (1)					
Tyr												
Phe											2,1 (2)	1,5 (2)
Lys		0,7 (1)									1,4 (1)	1,1 (1)
His	1,2 (1)		1,3 (1)	3,3 (2)	1,3 (1)	1,2 (1)						
Arg	1,0 (1)	2,1 (2)	1,0 (1)	1,5 (1)	1,1 (1)	1,2 (1)	1,8 (2)	0,9 (1)	1,8 (2)	0,8 (1)	1,9 (2)	0,9 (1)

Tab. 3, Fortsetzung:

Peptid	34-I 19	34-I 20	34-I 21	34-I 22	34-I 23	34-I 24	34-I 25	34-I 26	34-I 27	34-I 29	34-I 30	34-I 31
Pos.	162-188	189-192	193-207	208-212	213-219	220-249	250-256	257-267	268-269	272-287	291-329	330-336
Asx	3,8 (4)	0,7 (1)		0,8 (1)		3,7 (3)		3,4 (3)		2,0 (2)	4,2 (5)	2,3 (2)
Thr										1,7 (2)	1,7 (2)	
Ser	1,3 (1)				0,7 (1)	4,5 (6)		0,8 (1)		0,9 (1)	2,7 (3)	
Glx	1,4 (1)			1,2 (1)	1,1 (1)	3,8 (3)		2,1 (2)			3,4 (3)	
Pro	0,8 (1)	2,8 (3)				2,3 (2)	1,0 (1)					
Gly	2,3 (2)	1,3 (1)			1,4 (1)	3,7 (3)	1,3 (1)			2,4 (2)	4,7 (4)	1,0 (1)
Ala	2,0 (2)	0,9 (1)					0,8 (1)			1,0 (1)	2,2 (2)	1,1 (1)
Val	0,7 (1)				0,6 (1)	0,8 (1)		0,7 (1)		0,7 (1)	3,2 (3)	
Met		1,5 (2)				1,0 (1)	0,7 (1)	0,9 (1)		1,7 (2)	2,7 (3)	0,8 (1)
Ile	2,4 (2)	0,9 (1)				1,1 (1)		0,9 (1)		1,8 (2)	4,3 (4)	
Leu	1,1 (1)				2,1 (2)	4,2 (5)	0,9 (1)				1,5 (2)	
Tyr	1,8 (2)	1,7 (2)		0,9 (1)		1,5 (2)						
Phe	2,8 (3)	0,9 (1)				1,1 (1)						
Lys	1,0 (1)	0,8 (1)										
His	3,8 (4)	1,4 (1)										
Arg		1,1 (1)	1,1 (1)	1,1 (1)	1,0 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)	+	0,9 (1)	1,3 (1)	0,7 (1)
						1,2 (1)	1,1 (1)			2,0 (2)	0,8 (1)	1,1 (1)

+ = entsprechende Aminosäure nachgewiesen

Tab. 3, Fortsetzung:

Peptid	34-T-Y 1	34-T-S 1
Pos.	200-207	239-249
Asx		
Thr		
Ser		3,7 (4)
Glx	1,9 (2)	
Pro		
Gly		2,3 (2)
Ala	1,2 (1)	
Val		0,9 (1)
Met	1,5 (2)	
Ile		
Leu		1,8 (2)
Tyr		0,8 (1)
Phe		
Lys		
His	1,2 (1)	
Arg	1,1 (1)	1,3 (1)

Astacus-Protease und Sequenzierung der entsprechenden Peptide bestimmt wurde (siehe Abschnitt C.I.4.d).

34-T 31 (Pos. 330-336) stellt das C-terminale Peptid im d-Tn 34 dar und entspricht dem Peptid 34-CB 8-T 2.

d) Nachspaltung von 34-T-Peptiden

Bei dem Peptid 34-T 7 (Pos. 68-80) war zunächst aufgrund einer mißlungenen AS-Analyse nicht klar, ob das Peptid tatsächlich mit Arg(80) endet. Es wurde daher mit Chymotrypsin gespalten und das Spaltgemisch durch HPLC (Vydac-Säule, TFA-System) aufgetrennt. Neben dem Ausgangs-peptid 34-T 7 (unvollständige Spaltung) wurden die beiden Peptide 34-T 7-Ch 1 (Pos. 68-75) und 34-T 7-Ch 2 (Pos. 76-80) erhalten (Abb. 8). Ein weiteres Peptid konnte nicht isoliert werden. Damit konnte mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, daß das Ausgangs-peptid mehr als 13 Aminosäuren enthält.

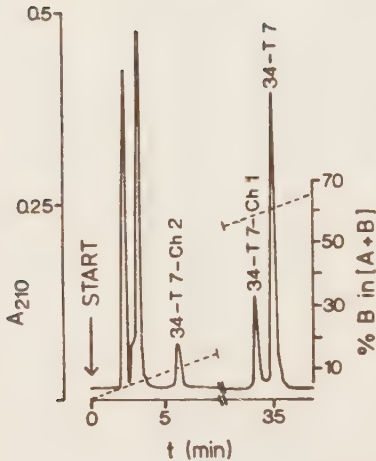


Abb. 8:
HPLC der chymotryptischen Peptide aus
Abb. 8:
HPLC der chymotryptischen Peptide aus der
Nachspaltung von 34-T 7.
Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); TFA-
System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.
Die Elution des Ausgangs-peptids zeigt, daß
die Spaltung unvollständig ablief.

Das Peptid 34-T 30 (Pos. 291-329) ist das größte tryptische Peptid in d-Tn 34. Da es unmöglich erschien, das Peptid durchzusequenzieren, wurde versucht, es in kleinere Bruchstücke zu zerlegen, die einer Sequenzanalyse eher zugänglich sein würden. Aufgrund der AS-Zusammensetzung des Peptids wurde zur Nachspaltung Astacus fluviatilis-Protease verwendet, die von ZWILLING et al. (1981) für die Sequenzanalyse eingeführt wurde. Diese Protease spaltet bevorzugt Peptidbindungen N-terminal von Aminosäuren mit kurzen Seitenketten, besonders jene der Hydroxy-Aminosäuren Serin und Threonin. Das Spaltgemisch wurde dann durch HPLC (Vydac-Säule, TFA-System) aufgetrennt (Abb. 9). Das Peptid 34-T 30-AP 1 wurde in zwei Fraktionen eluiert. Die AS-Analyse zeigte jedoch keinen deutlichen Unterschied in der Zusammensetzung. 34-T 30-AP 2 wurde zusammen mit einem Peptid eluiert, dessen N-terminale Sequenz identisch der Sequenz von 34-T 30-AP 3 ist. 34-T 30-AP 3, wie es im Sequenzschema der Abb. 30 dargestellt ist, wurde in der ersten Gipfelfraktion eluiert. Die anderen Gipfel, die ebenfalls mit der Ziffer 3 bezeichnet sind, können Peptiden zugeordnet werden, die sich in der Länge von 34-T 30-AP 3 nur um wenige Aminosäuren unterscheiden und daher mit verschiedenen Retentionszeiten eluiert wurden.

Durch die Nachspaltung von 34-T 30 mit Astacus-Protease und die Sequen-

zierung der dabei entstandenen Peptide gelang es, einen großen Teil der Sequenz des Ausgangs-peptids zu bestimmen. 34-T 30-AP 1 (Pos. 291-309) konnte 10 Schritte abgebaut werden. Das Peptid stellt die Überlappung zwischen 34-CB 7-SP 1 und 34-CB 7-Ch 1 her. Die Sequenzen der Peptide 34-T 30-AP 2 (Pos. 310-316) und 34-T 30-AP 3 (Pos. 317-324) sind schon durch das Peptid 34-SP 7 abgedeckt. Da dieses aber nicht bis zum C-Terminus abgebaut werden konnte, ist das Peptid 34-T 30-AP 4 (Pos. 321-329) von großer Bedeutung, da dieses Peptid die BrCN-Peptide 34-CB 7 und 34-CB 8 überlappt.

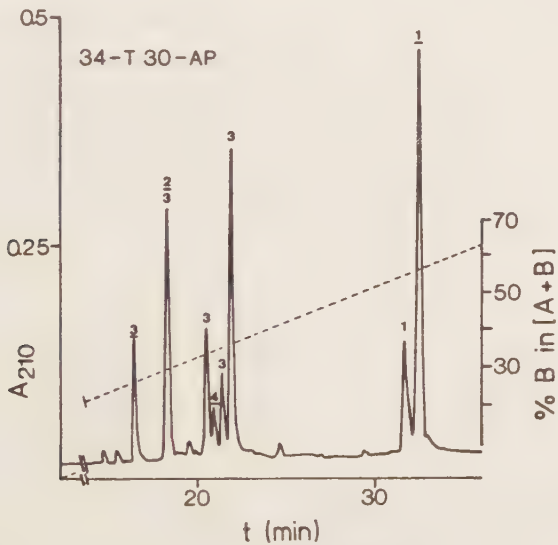


Abb. 9:

HPLC der Peptide aus der Nachspaltung von 34-T 30 mit *Astacus*-Protease.
Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); IFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.
Gipfelfraktionen, die Peptide mit gleicher Anfangssequenz enthalten, sind mit derselben Nummer gekennzeichnet. Diejenigen Gipfel, deren entsprechende Peptide im Sequenzschema der Abb. 30 dargestellt sind, wurden durch unterstrichene Nummern gekennzeichnet.

5. Peptide aus d-Tn 37

a) Bromcyan-Spaltung von d-Tn 37

Durch die folgenden Versuche sollte nach Spaltbedingungen gesucht werden, bei denen die BrCN-Spaltung einerseits fast vollständig abläuft, andererseits aber möglichst wenig Peptide durch Säurespaltung an Asp-Pro-Bindungen entstehen würden.

Dazu wurden 5 mg denaturiertes und carboxymethyliertes d-Tn 37 mit BrCN (70facher molarer Überschuß in Bezug auf Methionin) versetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach verschiedenen Zeiten (1 h, 2 h, 5 h, 8 h und 24 h) wurden aus dem Reaktionsgemisch gleiche Probenvolumina entnommen und die Spaltung gestoppt. Zusätzlich wurde ein Teil der Probe ohne BrCN 24 Stunden stehen gelassen, um den Einfluß von 70%iger Ameisensäure auf das Protein zu ermitteln. Der Verlauf der Spaltung wurde durch analytische SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (10-20 % Acrylamid) untersucht (Abb. 10).



Abb. 10:
Schematische Darstellung der SDS-Gelelektrophorese zur Zeitabhängigkeit der BrCN-Spaltung des reduzierten und carboxymethylierten d-Tn 37. Inkubation mit dem 70fachen molaren Überschuß an BrCN. Die Peptide wurden durch ihre Molekulargewichte charakterisiert.
a) 1 h, b) 2 h, c) 5 h, d) 8 h, e) 24 h, f) Kontrolle, Inkubation in Ameisensäure ohne BrCN.

Man erkennt, daß das Ausgangsmolekül (d-Tn 37) nach 5 Stunden völlig verschwunden ist. Das Spaltmuster nach 8stündiger BrCN-Einwirkung unterscheidet sich kaum vom 24-Stunden-Spaltmuster. Neben einem Peptid (37-CB 3), dessen relative Molekülmasse aus dem SDS-Gel zu 23000 bestimmt wurde, sind noch 4 größere Peptide ("Oberbanden") erkennbar. Kleinere Bruchstücke waren im SDS-Gel nicht erkennbar. Die Summe der relativen Molekülmassen von 37-CB 3 und der Peptide mit größerer

Mr als 23000 übersteigen die Mr von d-Tn 37 weit. Da aber andererseits das Peptid 37-CB 3 kein Methionin enthält (AS-Analyse!), muß es sich bei den Peptiden mit einer Mr größer als 23000 um unvollständig gespaltene BrCN-Peptide handeln, also um Peptide, die noch ein oder mehrere Methioninreste enthalten. Ein zusätzlicher Hinweis dafür ist die geringere Intensität der "Oberbänder" im SDS-Gel und die Tatsache, daß später durch HPLC kleinere, im SDS-Gel nicht sichtbare, Peptide isoliert werden konnten. Die Ameisensäure zeigte nach 24stündiger Inkubation bei Raumtemperatur keinen im SDS-Gel sichtbaren Effekt.

Ein aliquoter Teil des Reaktionsgemisches wurde nach dem Stoppen der Reaktion (Entfernung des BrCN durch Lyophilisation) erneut im Dunkeln für 24 Stunden bei Raumtemperatur mit BrCN stehengelassen. Das entsprechende Spaltmuster unterschied sich nicht vom Spaltmuster, das nach einmaliger 24stündiger Inkubation erhalten wurde.

Auch die Durchführung der BrCN-Spaltung bei 37°C ließ am Spaltmuster keine Änderung erkennen. Die Bildung von niedermolekularen, im Gel nicht erkennbaren Säurespaltungs-Peptiden kann allerdings nicht ausgeschlossen werden (MARKL et al., 1979).

Die AS-Analyse von d-Tn 37 ließ wie bei d-Tn 34 auf 7 Methioninreste schließen. Daher mußten aus der BrCN-Spaltung, vollständige Spaltung vorausgesetzt, 8 Peptide hervorgehen. Zunächst wurde versucht, das große BrCN-Bruchstück, dessen relative Molekülmasse im SDS-Gel zu 23000 bestimmt wurde (später als 34-CB 3 bezeichnet), zu isolieren. 7 mg d-Tn 37 waren 24 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln gespalten worden, und das Spaltgemisch über den Kationenaustauscher CM-Sephadex CL 6B (1 x 15 cm) aufgetrennt. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 0 - 0,3 M Natriumchlorid in 0,05 M Natriumacetat-Puffer, 8 M Harnstoff, pH 4,5 (Abb. 11). Die SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß die Fraktionen 33 - 35 sauberes 37-CB 3 enthielten. Die nachfolgenden Fraktionen enthielten die Peptide mit höherer Mr als 23000. Das Peptid 37-CB 3, das mit ca. 30%iger Ausbeute erhalten wurde, wurde nach Entsalzung über Sephadex G-10 im lyophilisierten Zustand bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

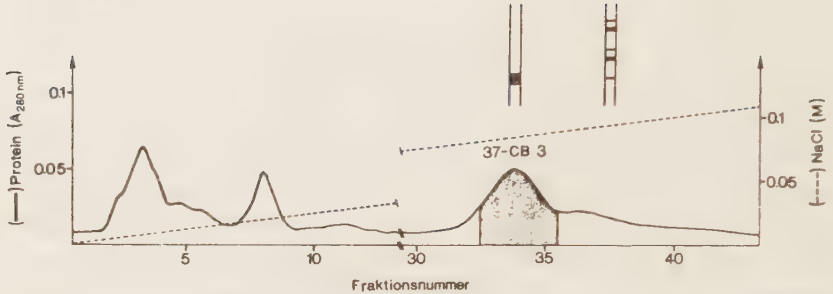


Abb. 11:

Isolierung des BrCN-Peptids 37-CB 3 über CM-Sephadex CL-6B.

Säule: 1,5 x 15 cm; Elution: 0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,5, 8 M Harnstoff; Gradient: 0 - 0,3 M NaCl (200 + 200 ml); Flußrate: 6 ml/h; 3 ml-Fraktionen.

Der Bereich, der 37-CB 3 rein enthielt, ist durch Raster hervorgehoben. Die eingesetzten Gele sind das Ergebnis der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Gipfelfraktionen, die 37-CB 3 enthielten und der nachfolgenden Fraktionen. Die Gipfel der Anfangsfraktionen enthielten die kleineren BrCN-Peptide.

Zur Isolierung der kleineren BrCN-Peptide wurden 23 mg d-Tn 37 (reduziert und carboxymethyliert) mit BrCN unter denselben Bedingungen wie oben gespalten und das lyophilisierte Spaltgemisch in 2 ml 50%iger (v/v) Ameisensäure gelöst und durch Gelfiltration über Sephadex G-25 superfine (1,5 x 100 cm) mit 0,2 N Essigsäure als Elutionsmittel vorgetrennt. Das Elutionsprofil wurde in 7 Bereiche aufgeteilt (Abb. 12) und die entsprechenden Fraktionen vereinigt.

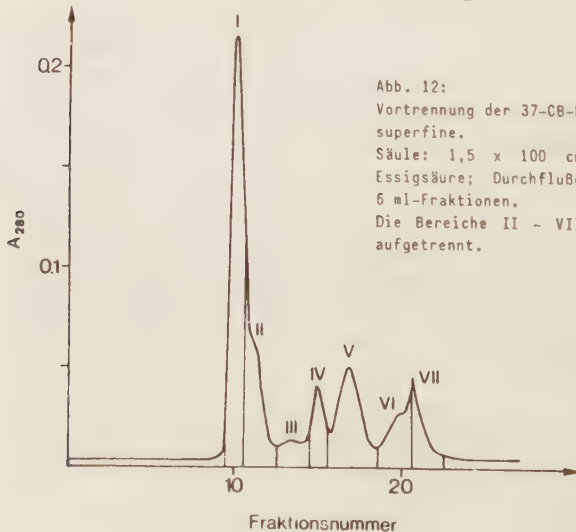


Abb. 12:

Vortrennung der 37-CB-Peptide über Sephadex G-25 superfine.

Säule: 1,5 x 100 cm; Elutionsmittel: 0,2 N Essigsäure; Durchflußgeschwindigkeit: 4 ml/h; 6 ml-Fraktionen.

Die Bereiche II - VII wurden mit HPLC weiter aufgetrennt.

Der Bereich I enthielt, wie die SDS-Gelelektrophorese zeigte, das Peptid 37-CB 3 und die in geringer Menge auftretenden, größeren, unvollständig gespaltenen BrCN-Peptide. Die Bereiche II - VII aus der Gelfiltration wurden in je 300 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und der HPLC unterworfen. Die Trennung erfolgte mit dem Acetat-System. Die Bereiche II und III enthielten die Peptide 37-CB 4 (in geringer Menge), 37-CB 6 und 37-CB 7 (Abb. 13), der Bereich IV enthielt die Peptide 37-CB 4, 37-CB 8 und 37-CB 1 (Abb. 14), der Bereich V 37-CB 1 und 37-CB 2 (Abb. 15). Aus den Bereichen VI und VII konnten keine BrCN-Peptide isoliert werden. Der Gipfel VII ist wohl auf Ameisensäure zurückzuführen.

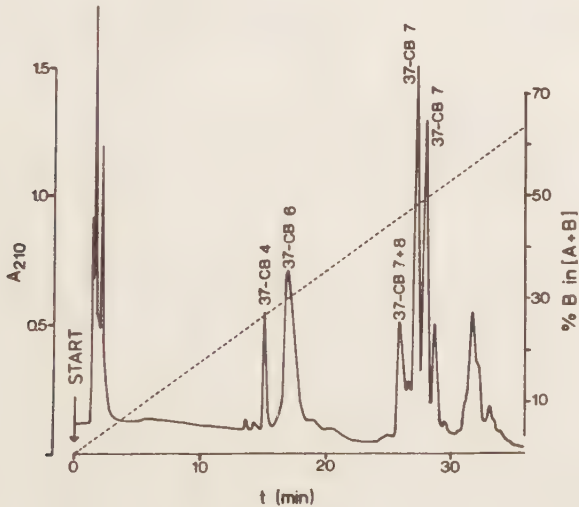


Abb. 13:

HPLC der BrCN-Peptide aus Bereich II und III der Gelfiltration.

Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 300 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und in Portionen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

Die beiden Gipfel des Peptids 37-CB 7 beruhen wohl darauf, daß das Peptid in der Homoserin- und Homoserin-Lacton-Form eluiert wurde.

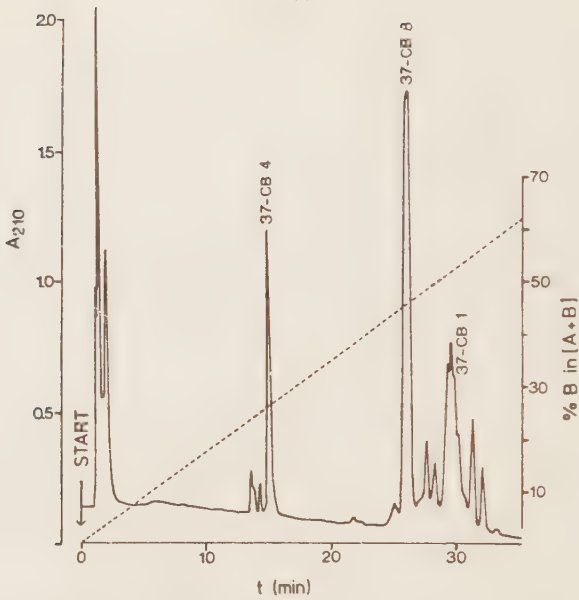


Abb. 14:

HPLC der BrCN-Peptide aus Bereich IV der Gelfiltration:

Chromatographische Bedingungen wie in Abb. 13 angegeben. Das Peptidgemisch wurde in 300 μ l eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und in Portionen zu je 100 μ l auf die Säule aufgetragen.

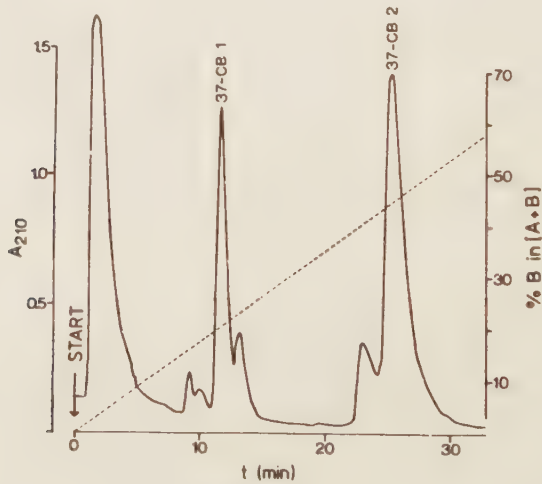


Abb. 15:

HPLC der BrCN-Peptide aus Bereich V der Gelfiltration.

Chromatographische Bedingungen wie in Abb. 13 angegeben. Das Peptidgemisch wurde in 300 μ l eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und in Portionen zu je 100 μ l auf die Säule aufgetragen.

Bei den isolierten 37-CB-Peptiden wurden folgende Sequenzen gefunden:

37-CB 1 (Pos. 337-344):

Tyr-Arg-Thr-Asn-Pro-Gly-Val-Met

37-CB 2 (Pos. 345-363):

Asp-Asp-Thr-Ser-Thr-Ser-Leu-Arg-Asp-Pro-Ile-Phe-Tyr-Arg-Tyr-His-Arg-Trp-
-Met

37-CB 3 (Pos. 364-537):

(Asp)*-Asn-Ile-Phe-Gln-Glu-Tyr-

37-CB 4 (Pos. 538-547):

Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Lys-Glu-Arg-Gly-Met

37-CB 6 (Pos. 555-592):

Leu-Thr-Asp-Tyr-Glu-Glu-Asp-Ser-Val-

37-CB 7 (Pos. 593-613):

Gly-Tyr-Pro-Phe-Asp-Arg-Pro-Ile-Gln-Val-Arg-Thr-Pro-

37-CB 8 (Pos. 614-627):

Ala-Phe-Gln-Glu-Ile-Ile-Ile-Gln-Tyr-

Mit Ausnahme von Peptid 37-CB 8 enden die untersuchten BrCN-Peptide mit Methionin (Homoserin/Homoserin-Lacton), wie die entsprechenden AS-Analysen zeigen (Tab. 4). Die Peptide konnten entweder bis zum C-Terminus sequenziert werden (37-CB 1, 37-CB 2) oder so weit, daß eine eindeutige Zuordnung zu den BrCN-Peptiden, die aus der UE d isoliert worden waren, möglich war.

Das Peptid 37-CB 1 (Pos. 337-344) wurde manuell nur bis Schritt 4 abgebaut. Durch Homoserin-Lacton-Kopplung an APG-Glas konnte das Peptid von SALNIKOW vollständig abgebaut werden. Das Peptid 37-CB 1 ist in Peptid CB 8 (aus der UE d isoliert), dessen N-terminale Sequenz mit der Sequenz von 34-CB 8 übereinstimmt, enthalten. Daraus kann man schließen, daß es sich bei 37-CB 1 um das N-terminale BrCN-Peptid im d-Tn 37 handelt. Das Peptid CB 8 (aus UE d) ist also das überlappende Peptid der zwei großen Fragmente, die durch limitierte Proteolyse

* nicht bestimmt

erhalten wurden. Dies bedeutet, daß bei der tryptischen Spaltung der nativen UE d zwischen den Aminosäuren Arginin (Pos. 336) und Tyrosin (Pos. 337) gespalten wurde.

Das Peptid 37-CB 2 (Pos. 345-363) konnte manuell bis Schritt 11 abgebaut werden, durch Homoserin-Lacton-Kopplung an APG-Glas (SALNIKOW) gelang der vollständige Abbau. Das Peptid enthält den bemerkenswerten Sequenzabschnitt -Thr-Ser-Thr-Ser-. Möglicherweise liegt dieser Sequenzabschnitt an der Oberfläche des Moleküls, da die Trypsin-Spaltstelle des nativen Moleküls nur ca. 10 AS-Positionen entfernt ist.

Das Peptid 37-CB 3 (Pos. 364-537) wurde nach Lysinkopplung an DITC-Glas von EYERLE 7 Schritte abgebaut. Die erste Aminosäure (Asparaginsäure) konnte aufgrund der Kopplung der N-terminalen Aminosäure an DITC-Glas nicht identifiziert werden. Die übrige Sequenz wurde zum größten Teil von mir durch Spaltung mit Trypsin, sowie durch Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease (SCHARTAU) aufgeklärt. Die molekulare Masse wurde durch SDS-Gelelektrophorese zu 23000 Dalton bestimmt (siehe oben). Die wahre Molekülmasse (bestimmt aus der etablierten Sequenz) beträgt dagegen 20369. Das Peptid 37-CB 3 ist damit bei weitem das größte BrCN-Peptid, sowohl in d-Tn 37 als auch in der UE d. Mit 174 Aminosäuren entspricht dieses Peptid ca. 60 % von d-Tn 37. Das Peptid 37-CB 4 (Pos. 538-547) konnte 8 Schritte manuell abgebaut werden. Aus der AS-Analyse war ersichtlich (Tab. 4), daß das Peptid noch die zwei Aminosäuren Glycin und Methionin enthalten mußte. Die Reihenfolge ergab sich aus der Tatsache, daß in einem BrCN-Peptid Methionin C-terminal stehen muß.

Das BrCN-Peptid 37-CB 5 (Pos. 548-554) konnte aus dem Peptidgemisch der Spaltung von d-Tn 37 nicht isoliert werden, fand sich aber im Spaltgemisch der UE d (SCHARTAU).

Die Peptide 37-CB 6 (Pos. 555-592) und 37-CB 7 (Pos. 593-613) wurden bis Schritt 9 bzw. bis Schritt 13 abgebaut.

Bei Peptid 37-CB 8 (Pos. 614-627), das bis Schritt 9 abgebaut wurde, zeigte die AS-Analyse kein Homoserin/Homoserin-Lacton. Daraus konnte gefolgert werden, daß es sich hier um das C-terminale BrCN-Peptid von d-Tn 37 und damit der UE d handelt.

Tab. 4:

Aminosäurezusammensetzung der aus d-Tn 37 isolierten Bromcyan-Peptide.

Die Werte, die auf 24stündiger Hydrolyse beruhen, wurden nicht im Hinblick auf Zerstörung der Aminosäuren oder unvollständige Hydrolyse extrapoliert. Der Methionin-Gehalt in den Peptiden wurde aus den Homoserin/Homoserin-Lacton-Werten erschlossen. Cystein und Tryptophan wurden nicht bestimmt. Die Anzahl der Aminosäuren in den Peptiden, die beim schrittweisen Abbau erfaßt wurde, ist in Klammern angegeben.

Peptid	37-CB 1	37-CB 2	37-CB 4	37-CB 6	37-CB 7	37-CB 8
Pos.	337-344	345-363	538-547	555-592	593-613	614-627
Asx	1,3 (1)	3,5 (3)		5,7 (6)	2,0 (2)	
Thr	1,1 (1)	2,0 (2)		2,3 (2)	1,9 (2)	
Ser		2,0 (2)		2,1 (2)	1,0 (1)	
Glx			1,3 (1)	6,0 (7)	1,9 (2)	3,8 (4)
Pro	1,0 (1)	1,2 (1)	0,7 (1)	0,8 (1)	3,6 (4)	
Gly	1,3 (1)		2,4 (2)	3,7 (3)	1,2 (1)	1,4 (1)
Ala				4,4 (4)		1,2 (1)
Val	1,0 (1)		1,1 (1)	2,0 (2)	0,8 (1)	
Met	0,6 (1)	0,7 (1)	0,5 (1)	0,6 (1)	0,8 (1)	
Ile		0,6 (1)		0,9 (1)	1,2 (1)	2,3 (3)
Leu		1,0 (1)	1,0 (1)	0,8 (1)		
Tyr	0,7 (1)	2,0 (2)		1,8 (3)	0,9 (1)	0,7 (1)
Phe		1,0 (1)			2,6 (2)	1,3 (1)
Lys			1,2 (1)	4,9 (4)	1,2 (1)	1,0 (1)
His	1,0 (1)					2,3 (2)
Arg	1,1 (1)	2,9 (3)	1,9 (2)		2,0 (2)	

b) Nachspaltung der Peptide 37-CB 7 und 37-CB 8

Das Peptid 37-CB 7 besitzt in Peptid-Position 11 ein Arginin. Es wurde daher versucht durch Nachspaltung des Peptids mit Trypsin in der Sequenzermittlung weiter voranzukommen. Das Spaltgemisch wurde im Acetat-System mit HPLC aufgetrennt. Vier Peptide konnten isoliert werden (Abb. 16). Sowohl das Peptid 37-CB 7-T 3 als auch das Peptid 37-CB 7-T 4 schließt den N-terminalen Abschnitt des Ausgangspeptids mit ein. Dies geht aus ihrem Gehalt an Homoserin/Homoserin-Lacton hervor. Das längere Peptid 37-CB 7-T 3 enthält eine ungespaltene Bindung zwischen den Aminosäuren Lysin und Threonin. Mit ihm konnte die Sequenz von Peptid 37-CB 7 um 6 AS-Positionen verlängert werden. Aus der partiellen Spaltung zwischen den Aminosäureresten Lys(609) und Thr(610) ging das kurze C-terminale Peptid 37-CB 7-T 4 hervor. Die ersten beiden Aminosäuren konnten durch manuellen Abbau bestimmt werden. Bei der Kürze des Peptids konnte dann aus der AS-Analyse

(Tab. 5) eindeutig auf die letzten beiden Aminosäuren Asparagin bzw. Asparaginsäure und Methionin (Homoserin/Homoserin-Lacton) geschlossen werden, wobei das Methionin C-terminal stehen muß.

Daß es sich bei dem BrCN-Peptid 37-CB 8 um das C-terminale Peptid handeln könnte, zeigte die AS-Analyse, die kein Homoserin/Homoserin-Lacton aufwies. Da das Peptid zwei Glutaminsäurereste enthält, wurde versucht nach Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease das C-terminale Peptid zu isolieren. Das Spaltgemisch wurde durch HPLC mit dem TFA-System aufgetrennt. Neben einer geringen Menge Ausgangspeptid wurden drei Peptide, die aus der Spaltung hervorgegangen waren, isoliert (Abb. 17). Diese drei Peptide wurden bis zum C-Terminus abgebaut. Bei der Kürze der Peptide ging dies aus den AS-Analysen eindeutig hervor (Tab. 5). Das Peptid 37-CB 8-SP 3 enthält keine Glutaminsäure und auch kein Homoserin-Lacton. Daraus muß man schließen, daß es sich um das C-terminale Peptid handelt.

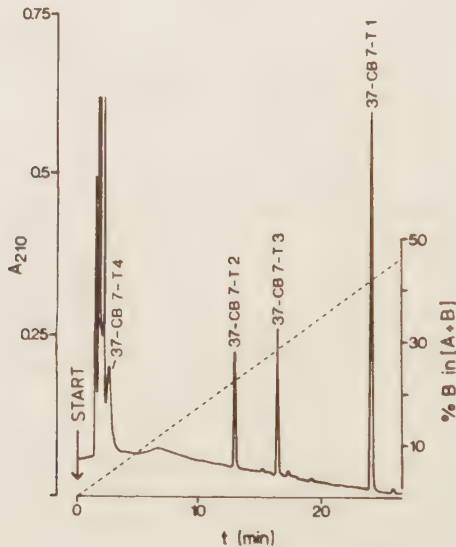


Abb. 16:

HPLC der tryptischen Peptide aus der Nachspaltung von 37-CB 7.
Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.
Das Peptidgemisch wurde in 200 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und in zwei Portionen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

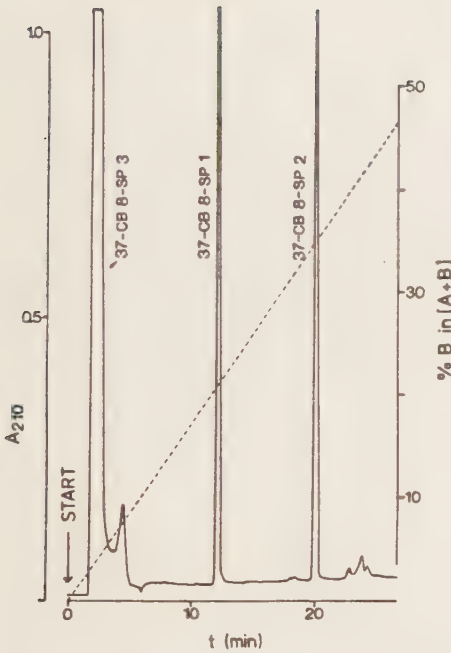


Abb. 17:

HPLC der SP-Peptide aus der Nachspaltung von 37-CB 8 mit *Staphylococcus aureus*-Protease.

Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 200 µl 0,1 % TFA aufgenommen und in zwei Portionen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

Das Peptid 37-CB 8-SP 3 war schon im "Auftragsgipfel" vorhanden. Der kleine Gipfel rechts davon, der dem Ausgangs-peptid entspricht, zeigt, daß die Spaltung fast vollständig ablief.

Tab. 5:

Aminosäurezusammensetzung von Peptiden aus der Nachspaltung der Peptide 37-CB 7 mit Trypsin und 37-CB 8 mit *Staphylococcus aureus*-Protease.

Die Werte, die auf 24stündiger Hydrolyse beruhen, wurden nicht im Hinblick auf Zerstörung der Aminosäuren oder unvollständige Hydrolyse extrapoliert. Der Methionin-Gehalt in den Peptiden wurde aus den Homoserin/Homoserin-Lacton-Werten erschlossen. Die Anzahl der Aminosäuren in den Peptiden, die beim schrittweisen Abbau erfaßt wurde, ist in Klammern angegeben.

Peptid	37-CB 7-T 3	37-CB 7-T 4	37-CB 8-SP 1	37-CB 8-SP 2	37-CB 8-SP 3
Pos.	604-613	610-613	614-617	618-623	624-627
Asx	1,1 (1)	1,1 (1)			
Thr	2,1 (2)	1,1 (1)			
Ser	1,1 (1)				
Glx	1,4 (1)		1,8 (2)	2,4 (2)	
Pro	1,6 (2)	1,3 (1)			
Gly					1,0 (1)
Ala			1,1 (1)		
Val					
Met	0,5 (1)	0,4 (1)			
Ile				2,2 (3)	
Leu				1,1 (1)	
Tyr					
Phe	1,1 (1)		1,0 (1)		
Lys	1,1 (1)				0,9 (1)
His					2,1 (2)
Arg					

c) Trypsin-Spaltung von d-Tn 37

Im Bruchstück d-Tn 37 (aus der limitierten Trypsinolyse der UE d) wurden durch AS-Analyse 13 Lysinreste und 22 Argininreste bestimmt (SCHARTAU et al., 1981). Es war daher zu erwarten, daß die Spaltung mit Trypsin viele kleinere, manuell gut sequenzierbare, Peptide liefern würde.

11 mg d-Tn 37 wurden 8 Stunden mit Trypsin gespalten und das Spaltgemisch nach Lyophilisation durch HPLC (Hibar-RP-18-Säule, Fa. Merck) bei Verwendung des Acetat-Systems aufgetrennt (Abb. 18).

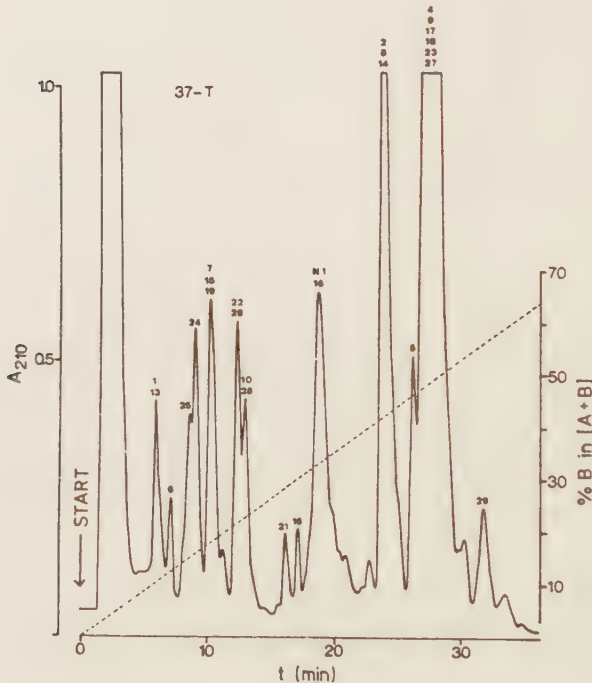


Abb. 18:

HPLC der tryptischen Peptide aus d-Tn 37.

Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 400 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und in 4 Portionen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

Die N-Terminus-Bestimmung mit kleinen Proben der Gipfelfraktionen zeigt, daß im Gegensatz zur Trennung der tryptischen Peptide aus d-Tn 34 nur 7 Peptide nach dieser ersten Trennung rein erhalten wurden. Diejenigen Gipfelfraktionen, die mehrere Peptide enthielten, wurden entweder mit einer Si100-RP-18-Säule der Fa. Serva im Acetat-System oder mit einer Vydac-RP-18-Säule der Fa. Chrompack im TFA-System weiter aufgetrennt. Peptide, die dennoch nicht rein erhalten worden waren, wurden durch eine zweite Nachreinigung mit der Vydac-RP-18-Säule im TFA-System oder der Si100-RP-18-Säule im Acetat-System isoliert. Das Isolierungsschema der Peptide ist in Abb. 19 dargestellt. Die Abbildungen 20 - 23 zeigen die Elutionsprofile, die bei der Nachreinigung der Peptide erhalten wurden.

d-In 37

Trypsin-Spaltung

Hibar-RP-18-Säule / Acetat-System

1. Trennung:

1. Nachreinigung:

2. Nachreinigung:

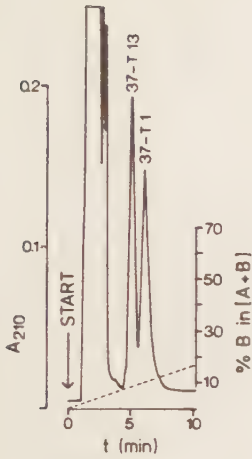


Abb. 20 a

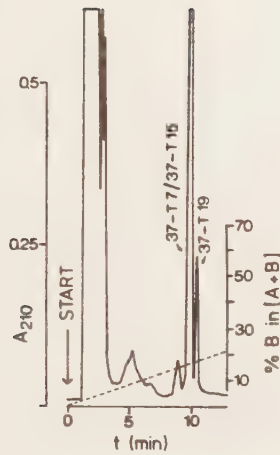


Abb. 20 b

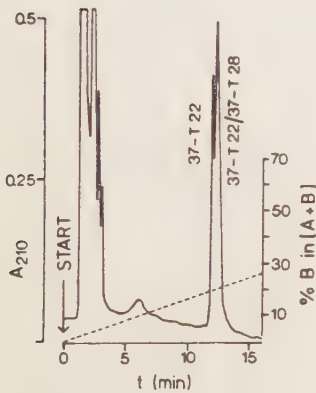


Abb. 20 c

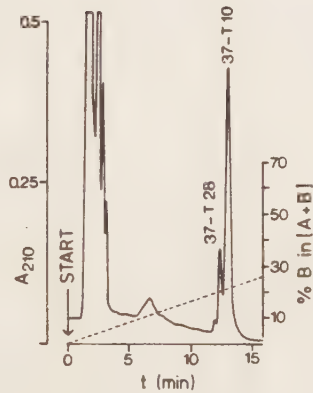


Abb. 20 d

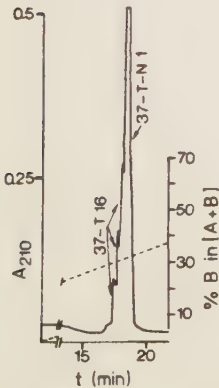


Abb. 20 e

Abb. 20:
HPLC-Läufe zur Trennung von tryptischen Peptiden, die beim ersten Trennversuch (Abb. 19) mit der Hibar-Säule der Fa. Merck bei Verwendung des Acetat-Systems in jeweils einem Gipfel eluiert wurden (1. Nachreinigung).
Säule: RP 18 (Sil100, Fa. Serva); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in [A+B]/40 min.
Folgende Peptidgemische wurden chromatographiert: a) 37-T 1, 37-T 13; b) 37-T 7, 37-T 15, 37-T 19; c) 37-T 22, 37-T 28; d) 37-T 10, 37-T 28; e) 37-T 16, 37-T-N 1.

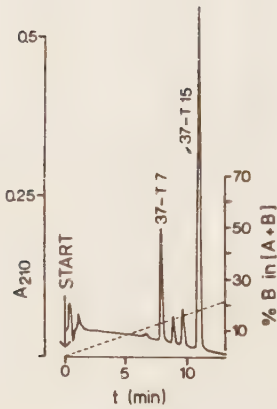


Abb. 21:
HPLC (2. Nachreinigung) zur Trennung der Peptide 37-T 7 und 37-T 15, die bei der 1. Nachreinigung (Abb. 20 b) gemeinsam eluiert wurden. Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.

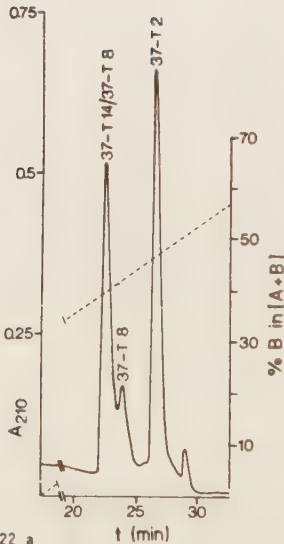


Abb. 22 a

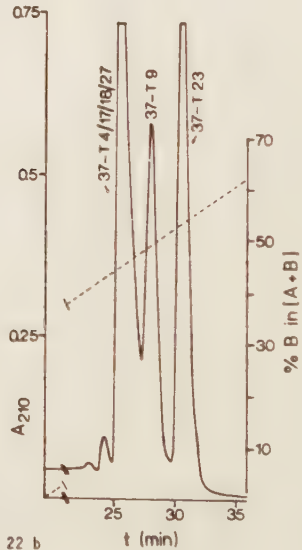


Abb. 22 b

Abb. 22:

HPLC-Läufe (1. Nachreinigung) zur Trennung von tryptischen Peptiden, die mit der Hibar-Säule der Fa. Merck bei Verwendung des Acetat-Systems in jeweils einem Gipfel eluiert wurden (Abb. 19).

Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.

Folgende Peptidgemische wurden chromatographiert: a) 37-T 2, 37-T 8, 37-T 14; b) 37-T 4, 37-T 9, 37-T 17, 37-T 18, 37-T 23, 37-T 27.

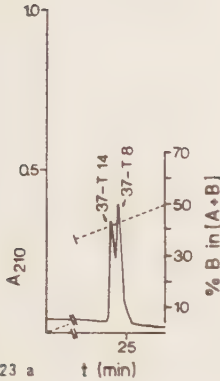


Abb. 23 a

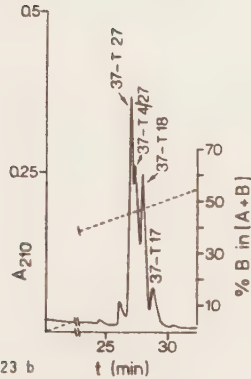


Abb. 23 b

Abb. 23:

HPLC (2. Nachreinigung) zur Trennung der bei der 1. Nachreinigung (Abb. 22) jeweils gemeinsam eluierten Peptide 37-T 8 und 37-T 14 sowie 37-T 4, 37-T 17, 37-T 18 und 37-T 27. Säule: RP 18 (Si100, Fa. Serva); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.

a) 37-T 8, 37-T 14; b) 37-T 4, 37-T 17, 37-T 18, 37-T 27.

Bei den aus d-Tn 37 (nicht am Ionenaustauscher gebunden) isolierten tryptischen Peptiden wurden folgende Sequenzen gefunden:

37-T 1 (Pos. 337-338):

Tyr-Arg

37-T 2 (Pos. 339-352):

Thr-Asn-Pro-Gly-Val-Met-Asp-Asp-Thr-Ser-Thr-Ser-Leu-Arg

37-T 4 (Pos. 372-388):

His-Arg-Leu-Pro-Ser-Tyr-Thr-His-Gln-

37-T 5 (Pos. 374-388):

Leu-Pro-Ser-Tyr-Thr-His-Gln-Gln-Leu-Asp-Phe-Pro-Gly-Val-Arg

37-T 6 (Pos. 389-391):

Ile-Ser-Arg

37-T 7 (Pos. 392-395):

Val-Thr-Val-Arg

37-T 8 (Pos. 396-407):

Ser-Lys-Val-Pro-Asn-Ile-Leu-His-Thr-Tyr-Ser-

37-T 9 (Pos. 408-420):

Asp-Ser-Leu-Leu-Glu-Leu-Ser-His-Gly-Leu-Asn-Ile-

37-T 10 (Pos. 421-426):

Gly-His-Ile-Gln-Val-

37-T 13 (Pos. 452-456):

Glu-Thr-Cys-Val-Arg

37-T 14 (Pos. 457-462):

Ile-Phe-Leu-Ala-Pro-

37-T 15 (Pos. 463-469):

Tyr-Asp-Glu-Leu-Gly-Asn-Arg

37-T 16 (Pos. 470-476):

Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-Gln-Arg

37-T 17 (Pos. 477-487):

Arg-Leu-Tyr-Ile-Glu-Leu-Asp-Lys-Phe-His-Arg

37-T 18 (Pos. 478-487):

Leu-Tyr-Ile-Glu-Leu-Asp-Lys-Phe-His-Arg

37-T 19 (Pos. 488-493):

Arg-Leu-Glu-Pro-Gly-

37-T 21 (Pos. 494-498):

Asn-Val-Leu-Val-Arg

37-T 22 (Pos. 499-509):

Ala-Ser-Gly-Asp-Ser-Ser-Val-Thr-Leu-Ser-

37-T 23 (Pos. 510-541):

Val-Pro-Thr-Phe-Glu-Glu-Leu-Glu-Ser-Gly-Asn-Ala-Asn-Val-

37-T 24 (Pos. 583-589):

Asp-Gln-Lys-Tyr-Pro-Asp-

37-T 25 (Pos. 586-589):

Tyr-Pro-Asp-Lys

37-T 27 (Pos. 591-603):

Ala-Met-Gly-Tyr-Pro-Phe-Asp-Arg-Pro-Ile-

37-T 28 (Pos. 604-609):

Thr-Pro-Ser-Gln-Phe-

37-T 29 (Pos. 610-627):

Thr-Pro-Asn-Met-Ala-Phe-Gln-Glu-Ile-Ile-

37-T-N 1 (Pos. 429-446):

Tyr-Glu-His-Leu-Asp-His-Glu-Pro-Tyr-Asn-Tyr-Glu-Ile-Glu-Val-

Von den aufgeführten Peptiden sind 24 echte tryptische Peptide, bei denen die Spaltung C-terminal von Lysin oder Arginin erfolgt war, und zusätzlich ein nicht erwartetes Peptid, bei dem nach Asparagin (Asn-X) gespalten worden war. 70 % der gesamten Sequenz von d-Tn 37 konnte durch die gefundenen Sequenzen abgedeckt werden. Auch bei d-Tn 37 gab es wie bei d-Tn 34 Bereiche starker Homologie zu Sequenzbereichen der UE e, so daß viele Peptide zunächst aufgrund von Homologien eingeordnet werden konnten.

37-T 1 (Pos. 337-338) ist ein Dipeptid, das am N-Terminus von d-Tn 37 steht. Wegen seiner Kürze hatte es keine Bedeutung für die Ermittlung der Gesamtsequenz und konnte erst später als N-terminales Peptid identifiziert werden, da sich kein weiteres Dipeptid finden ließ.

37-T 2 (Pos. 339-352) enthält die schon bei BrCN-Peptid 37-CB 2 erwähnte -Thr-Ser-Thr-Ser- Sequenz. Es überlappt die beiden BrCN-Peptide 37-CB 1 und 37-CB 2.

37-T 4 (Pos. 372-388) enthält in Pos. 373 ein Arginin, hinter dem keine Spaltung stattfand, möglicherweise unter dem Einfluß der Umgebung, in der sich Pro(375) befindet. Das Peptid, das mit 37-T 27 verunreinigt war, wurde gemeinsam mit diesem abgebaut, allerdings wegen der geringen Menge nur 9 Schritte. Andererseits ermöglichte der Intensitätsunterschied der Flecken auf den Chromatogrammen beide Peptide trotz ihres gemeinsamen Auftretens zu sequenzieren.

Das Peptid 37-T 5 (Pos. 374-388) zeigt, daß die Spaltung zwischen Arg(373) und Leu(374) grundsätzlich möglich ist, aber wahrscheinlich

verzögert abläuft (siehe 37-T 4). Dieses Peptid konnte vollständig abgebaut werden.

37-T 6 (Pos. 389-391) und 37-T 7 (Pos. 392-395) sind kurze Peptide, die mit den Peptiden 37-SP 2-T 4 und 37-SP 2-T 5 aus der Nachspaltung von 37-SP 2 (SCHARTAU) identisch sind. 37-T 6 überlappt mit einer Aminosäure das Peptid 37-SP 2-Ch 3, und 37-T 7 überlappt 37-SP 2-Ch 4 und 37-SP 2-Ch 5.

Bei 37-T 8 (Pos. 396-407) konnte das C-terminale Lysin aus der AS-Analyse erschlossen werden.

37-T 9 (Pos. 408-420) verknüpft die beiden Peptide 37-SP 2 und 37-SP 3 aus der Spaltung mit Staphylococcus aureus-Protease als einziges überlappendes Peptid, das gefunden wurde.

37-T 13 (Pos. 452-456) sichert die Überlappung von nur zwei Aminosäureresten zwischen den Peptiden AP 6 und 37-SP 5 stärker ab.

37-T 15 (Pos. 463-469) überlappt 37-SP 5 und 37-SP 6, 37-T 16 (Pos. 470-476) überlappt 37-SP 6 und 37-SP 7. Bemerkenswert sind die drei hintereinander angeordneten Leucinreste in 37-T 16, die sich in diesem Fall schon allein durch die AS-Analyse dieses Peptids von Isoleucin unterscheiden ließen, und die anschließende -Glu-Glu-Gln- Sequenz.

Die Peptide 37-T 17 (Pos. 477-487) bzw. 37-T 18 (Pos. 478-487) verbinden die Peptide 37-SP 7 und 37-SP 8, wobei 37-T 17 N-terminal noch ein Arginin enthält, das nicht abgespalten wurde. Nach Lys(484) konnte in keinem Fall eine Spaltung beobachtet werden.

Die Peptide 37-T 19 (Pos. 488-493) und 37-T 21 (Pos. 494-498) sind in Peptid 37-T 20 (Pos. 488-498) enthalten, in dem zwischen Lys(493) und Asn(494) nicht gespalten wurde (siehe Abschnitt C.I.6.b). 37-T 19 überlappt 37-SP 8 und 37-SP 9.

37-T 22 (Pos. 499-509) fällt auf durch seinen Gehalt von 4 Serinresten. 37-T 23 (Pos. 510-541) ist das längste tryptische Peptid in d-Tn 37. Zwischen Lys(533) und Pro(534) konnte keine Spaltung festgestellt werden (Lys-Pro-Bindung). Das Peptid konnte 14 Schritte weit abgebaut werden. Durch Nachspaltung mit Staphylococcus aureus-Protease (siehe Abschnitt C.I.5.d) konnte die Sequenz vom N-Terminus ausgehend um 5 Aminosäuren verlängert werden und 6 C-terminale Aminosäuren bestimmt werden.

37-T 24 (Pos. 583-589) zeichnet sich durch eine nicht gespaltene Lys-Tyr-Bindung aus, die aber spaltbar ist, wie das Peptid 37-T 25

(Pos. 586-589) zeigt. Da die AS-Analyse dieses kurzen Peptids ein Lysin anzeigt, ist klar, daß das Peptid 37-T 24, das nur bis zur vorletzten Aminosäure Asp(588) abgebaut werden konnte, tatsächlich mit Lys(589) endet.

37-T 27 (Pos. 591-603) stellt das Überlappungspeptid der beiden BrCN-Peptide 37-CB 6 und 37-CB 7 dar, wobei die Überlappung zum C-Terminus von 37-CB 6 allerdings nur 2 Aminosäuren beträgt. Das Peptid enthält eine Arg-Pro-Bindung, die von Trypsin erwartungsgemäß nicht gespalten wurde. Erstaunlicherweise wurde aber von SCHARTAU das tryptische Peptid 37-T 26 (Pos. 590-598) gefunden, das mit Arg(598) endet, also aus einer Arg-Pro-Spaltung hervorgegangen sein muß. Zudem ist dieses Peptid N-terminal um einen Lysinrest verlängert.

37-T 28 (Pos. 604-609) entspricht dem Peptid 37-CB 7-T 2, das aus einer Nachspaltung von 37-CB 7 hervorging. Es wurde im Gemisch mit 37-T 22 manuell abgebaut. Durch Abzug der Sequenz von 37-T 22, das auch als reines Peptid abgebaut worden war, konnte die Sequenz klar ermittelt werden.

37-T 29 (Pos. 610-627) ist das C-terminale tryptische Peptid von d-Tn 37, das bis Position 619 abgebaut wurde. Aus der AS-Analyse kann man folgern, daß dieses Peptid zwei Histidinreste und einen Lysinrest enthält. Dies bedeutet, daß das C-terminale His(627) nicht abgespalten wurde.

Aus der Spaltung von d-Tn 37 mit Trypsin ging ein nicht erwartetes Peptid hervor, 37-T-N 1 (Pos. 429-446). Die Spaltung fand zwischen den Aminosäuren Asn(428) und Tyr(429) in dem Sequenzabschnitt -Tyr-Asn-Tyr-Glu- statt. Derselbe Sequenzabschnitt ist in dem Peptid noch einmal enthalten. Dennoch blieb diese zweite Asn-Tyr-Bindung ungespalten. Durch Nachspaltung mit Staphylococcus aureus-Protease konnte die Sequenz dieses Peptids bis zum C-Terminus bestimmt werden (siehe Abschnitt C.I.5.d). Das Peptid überlappt mit 37-SP 4, das seinerseits in 37-T 12 bzw. AP 6 hineinläuft.

Tab. 6:

Aminosäurezusammensetzung der aus d-Tn 37 isolierten tryptischen Peptide.

Die Werte, die auf 24stündiger Hydrolyse beruhen, wurden nicht im Hinblick auf Zerstörung der Aminosäuren oder unvollständige Hydrolyse extrapoliert. Cystein und Tryptophan wurden nicht bestimmt. Die Anzahl der Aminosäuren in den Peptiden, die beim schrittweisen Abbau erfaßt wurde, ist in Klammern angegeben.

Peptid	37-I 1	37-I 2	37-I 5	37-I 6	37-I 7	37-I 8	37-I 9	37-I 10	37-I 13	37-I 14	37-I 15	37-I 16
Pos.	337-338	339-352	374-388	389-391	392-395	396-407	408-420	421-426	452-456	457-462	463-469	470-476
Asx		3,4 (3)	1,3 (1)			1,2 (1)	2,2 (2)				2,0 (2)	
Thr		2,7 (3)	1,0 (1)		1,1 (1)	0,7 (1)			1,2 (1)			
Ser		1,8 (2)	1,5 (1)	0,9 (1)		2,3 (2)	1,8 (2)					
Glx			1,8 (2)				1,3 (1)	1,1 (1)	1,3 (1)		1,1 (1)	3,3 (3)
Pro		0,8 (1)	1,9 (2)			0,8 (1)				0,8 (1)		
Gly		0,9 (1)	1,2 (1)				1,2 (1)	1,3 (1)		1,2 (1)	1,3 (1)	
Ala												
Val		0,7 (1)	0,7 (1)		2,1 (2)	0,8 (1)		0,7 (1)	0,8 (1)			
Met		0,6 (1)										
Ile				1,1 (1)						0,8 (1)		
Leu		0,8 (1)	1,7 (2)			0,7 (1)	1,3 (1)	0,9 (1)		1,1 (1)	1,1 (1)	2,4 (3)
Tyr	0,8 (1)		0,8 (1)			0,6 (1)	3,4 (4)			1,1 (1)	0,5 (1)	
Phe			1,1 (1)									
Lys						2,3 (2)	1,2 (1)	0,9 (1)		0,9 (1)		
His			0,9 (1)			1,3 (1)	0,8 (1)	1,1 (1)		1,1 (1)		
Arg	1,2 (1)	1,3 (1)	0,8 (1)	0,9 (1)	0,8 (1)				0,7 (1)		0,9 (1)	1,3 (1)

Tab. 6, Fortsetzung:

Peptid	37-T 17	37-T 18	37-T 19	37-T 21	37-T 22	37-T 23	37-T 24	37-T 25	37-T 27	37-T 28	37-T 29	37-T-N 1
Pos.	477-487	478-487	488-493	494-498	499-509	510-541	583-589	586-589	591-603	604-609	610-627	429-446
Asx	1,1 (1)	1,2 (1)		1,1 (1)	1,0 (1)	5,0 (5)	1,8 (2)	1,1 (1)	1,2 (1)		0,9 (1)	3,8 (4)
Thr					0,7 (1)	1,2 (1)				0,9 (1)	0,9 (1)	
Ser					3,9 (4)	2,5 (2)				1,1 (1)		
Glx	1,2 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)			5,8 (5)	0,8 (1)		0,8 (1)	1,1 (1)	3,7 (4)	4,4 (4)
Pro			1,4 (1)			5,0 (4)	0,9 (1)	1,0 (1)	1,8 (2)	1,0 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)
Gly			1,0 (1)		1,2 (1)	2,0 (2)			1,4 (1)		1,4 (1)	
Ala					1,3 (1)	1,3 (1)			1,1 (1)		1,3 (1)	
Val				2,2 (2)	1,3 (1)	2,6 (3)			0,7 (1)			0,7 (1)
Met						0,6 (1)			0,6 (1)		0,6 (1)	
Ile	1,1 (1)	0,8 (1)									2,6 (3)	0,8 (1)
Leu	2,1 (2)	2,2 (2)		0,9 (1)	0,6 (1)	2,0 (2)					1,1 (1)	1,1 (1)
Tyr	0,6 (1)	0,7 (1)	0,7 (1)			0,6 (1)	1,0 (1)	0,8 (1)	0,8 (1)		0,5 (1)	2,3 (3)
Phe	0,8 (1)	0,9 (1)				1,0 (1)			0,9 (1)	0,9 (1)	1,2 (1)	
Lys	0,9 (1)	1,3 (1)	0,7 (1)		1,1 (1)	0,7 (1)	2,2 (2)	1,1 (1)		1,1 (1)	1,0 (1)	
His	1,1 (1)	0,8 (1)				0,8 (1)					2,2 (2)	1,5 (2)
Arg	1,8 (2)	1,2 (1)	1,0 (1)	0,8 (1)		1,0 (1)			2,1 (2)			1,2 (1)

d) Nachspaltung von 37-T-Peptiden

Um in der Sequenzanalyse des Peptids 37-T-N 1 und des langen Peptids 37-T 23 weiter voranzukommen, wurde in beiden Fällen mit Staphylococcus aureus-Protease nachgespalten. Die entstandenen Spaltgemische wurden durch HPLC über die Vydac-RP-18-Säule im TFA-System aufgetrennt (Abb. 24 und 25).

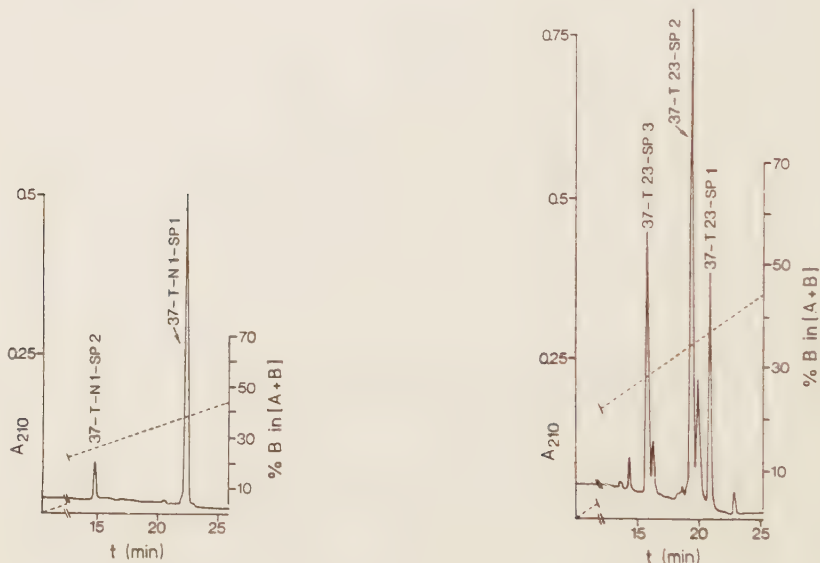


Abb. 24:
HPLC der SP-Peptide 37-T-N 1-SP 1 und 37-T-N 1-SP 2 aus der Nachspaltung von 37-T-N 1.

Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack);
TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.

Abb. 25:

HPLC der SP-Peptide 37-T 23-SP 1, 37-T 23-SP 2 und 37-T 23-SP 3 aus der Nachspaltung von 37-T 23 mit Staphylococcus aureus-Protease.

Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack);
TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.

Aus der Spaltung von 37-T-N 1 (Pos. 429-446) konnten zwei Glu-Peptide isoliert werden, das N-terminale und das C-terminale. Das zwischen diesen stehende Peptid (nicht benannt) wurde nicht gefunden. Dessen Sequenz war aber ohnehin schon aus dem Abbau des Ausgangspeptids

bekannt. Das C-terminale Peptid ermöglichte es aber die Sequenz um drei Aminosäuren bis zur C-terminalen Aminosäure zu verlängern. Dadurch konnte zugleich der Anschluß des Peptids 37-T 12 an 37-T 11 durch die jetzt erkennbare Überlappung durch das Peptid 37-SP 4 hergestellt werden.

Aus der Nachspaltung von 37-T 23 mit der Staphylococcus aureus-Protease gingen drei Peptide hervor. Die Sequenz von 37-T 23-SP 1 (Pos. 510-517) war schon aus dem Abbau des Ausgangspeptids bekannt. Bemerkenswert ist jedoch, daß zwischen Glu(514) und Glu(515) bzw. zwischen Glu(515) und Leu(516) nicht gespalten wurde. 37-T 23-SP 2 (Pos. 518-531) konnte zwar nicht wie 37-T 23-SP 1 bis zum C-Terminus abgebaut werden, ermöglichte aber, die Sequenz des Ausgangspeptids um fünf Positionen zu verlängern. Bei diesem Peptid fand zwischen Glu(527) und Tyr(528) keine Spaltung statt. Das Peptid endet mit Asp(531), wie die AS-Analyse zeigte, obwohl im leicht alkalischen Milieu (pH 8,0) die Spaltung nur an Glutaminsäureresten stattfinden sollte. Bei der Spaltung von d-Tn 37 mit Staphylococcus aureus-Protease (SCHARTAU) war das Tetrapeptid 37-SP 11 gefunden worden, das ebenfalls mit Asp(531) endet. Das Peptid 37-T 23-SP 3 (Pos. 536-541) konnte bis zum C-Terminus sequenziert werden. Es überlappt die BrCN-Peptide 37-CB 3 und 37-CB 4.

Tab. 7:

Aminosäurezusammensetzung von Peptiden aus der Nachspaltung der Peptide 37-T-N 1 und 37-T 23 mit Staphylococcus aureus-Protease.

24-Stunden-Hydrolysen; Cystein wurde nicht bestimmt. Die Anzahl der Aminosäuren in den Peptiden, die beim schrittweisen Abbau erfaßt wurde, ist in Klammern angegeben.

Peptid	37-T-N 1-SP 1	37-T-N 1-SP 2	37-T 23-SP 1	37-T 23-SP 2	37-T 23-SP 3
Pos.	429-435	441-446	510-517	518-531	536-541
Asx	0,9 (1)	2,0 (2)		4,4 (5)	
Thr			1,1 (1)		
Ser				1,8 (2)	
Glx	2,2 (2)	0,9 (1)	3,3 (3)	1,1 (1)	
Pro			0,8 (1)	1,2 (1)	0,9 (1)
Gly				1,0 (1)	
Ala				1,2 (1)	
Val		1,2 (1)	1,1 (1)	0,8 (1)	0,8 (1)
Met					0,6 (1)
Ile		1,0 (1)			
Leu	0,8 (1)		0,8 (1)		1,0 (1)
Tyr	0,8 (1)			0,6 (1)	
Phe			1,0 (1)		
Lys					
His	2,3 (2)				1,1 (1)
Arg		0,9 (1)			1,1 (1)

6. Peptide aus einem Gemisch von d-Tn 34 und d-Tn 37

a) Säure-Spaltung

Bei Behandlung eines Proteins mit verdünnter Säure für kürzere Zeit wird bevorzugt die Peptidbindung zwischen Asparaginsäure- und Prolin-Resten gespalten. Die Säure-Spaltung von Proteinen wird heute zur Sequenzermittlung selten angewandt. Dennoch wurde versucht, mit dieser Methode kleinere Peptide zu erhalten, die einer manuellen Sequenzierung gut zugänglich sein würden. Da aus der limitierten Trypsinolyse der UE d noch ein Gemisch der beiden großen Fragmente d-Tn 34 und d-Tn 37 zur Verfügung stand, wurde dieses für die Versuche zur Säure-Spaltung herangezogen.

Zur Spaltung wurden 5 mg d-Tn 34/d-Tn 37-Gemisch (reduziert und carboxymethyliert) in 10 ml 0,0125 M HCl, pH 2,0, gelöst und 2 Stunden bei 110°C hydrolysiert (INGLIS et al., 1980). Nach dem Abkühlen wurde das Spaltgemisch lyophilisiert und durch HPLC mit dem Acetat-System aufgetrennt (Abb. 26).

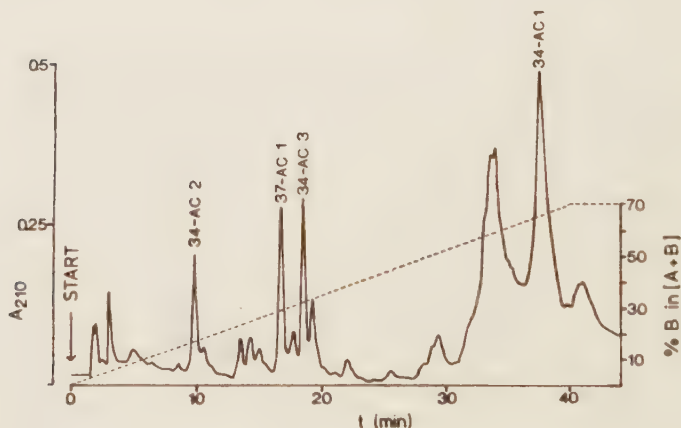


Abb. 26:

HPLC der Peptide aus der Säurespaltung von d-Tn 34/d-Tn 37-Gemisch.

Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 200 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und in zwei Portionen zu je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

4 kleinere Peptide wurden in scharfen Gipfeln eluiert. Durch Bestimmung der N-Termini kleiner aliquoter Mengen der Gipfelfraktionen wurde zunächst die Reinheit der isolierten Peptide festgestellt. Die Sequenzierung mit größeren Peptidmengen erbrachte folgende Ergebnisse:

34-AC 1 (Pos. 1-22):

Thr-Ile-Ala-Asp-His-

34-AC 2 (Pos. 23-30):

Pro-Leu-Pro-Glu-Ala-Glu-Arg-Asp-

34-AC 3 (Pos. 136-152):

Pro-Asn-Lys-Asp-Thr-Val-Val-Pro-

37-AC 1 (Pos. 337-353):

Tyr-Arg-Thr-Asn-Pro-

Von den drei Peptiden, die aus d-Tn 34 stammen, ging 34-AC 1 (Pos. 1-22) aus der Spaltung zwischen Asp(22) und Pro(23) hervor. Es zeigt die Anfangssequenz der UE d.

Das Peptid 34-AC 2 (Pos. 23-30) schließt in der Sequenz an 34-AC 1 an und beginnt mit einem Prolin. Das Peptid konnte bis zur vorletzten Aminosäure abgebaut werden und sicherte die Sequenz von 34-T 2.

Peptid 34-AC 3 (Pos.136-152) ging aus der Spaltung zwischen Asp(135) und Pro(136) einerseits und Asp(152) und Pro(153) andererseits hervor. Dieses Peptid entstand auch bei der Hydrolyse des BrCN-Peptids 34-CB 2 mit 25%iger Ameisensäure (SCHARTAU). 34-AC 3 stellt die Überlappung von 34-T 12 bzw. 34-T 15 und 34-T 16 bzw. 34-T 17 her und ist somit außerordentlich wichtig. Diese drei Peptide belegen, daß alle Asp-Pro-Bindungen in d-Tn 34 mit Salzsäure unter den genannten Bedingungen hydrolysierbar sind:

Peptid 37-AC 1 (Pos. 337-353) weist dieselbe Anfangssequenz (Tyr-Arg-Thr-Asn) auf wie BrCN-Peptid 37-CB 1. Da die Säure-Hydrolyse ja an einem Gemisch von d-Tn 34 und d-Tn 37 durchgeführt wurde, dient dieses Peptid zur Absicherung dafür, daß es sich bei 37-CB 1 um das N-terminale BrCN-Peptid von d-Tn 37 handelt.

Bei der Spaltung der UE d mit BrCN (SCHARTAU) entstand das anschließende Peptid 37-AC 2 (Pos. 354-363). Nur diese eine Asp-Pro-Bindung in Position 353-354 wurde also unter den Bedingungen der BrCN-Spaltung hydrolysiert.

Tab. 8:

Aminosäurezusammensetzung der Peptide aus der Säure-Spaltung von d-Tn 34/d-Tn 37-Gemisch. 24-Stunden-Hydrolysen; Methionin in 37-AC 1 konnte nicht nachgewiesen werden, da diese Aminosäure vermutlich unter den Spaltbedingungen oxidativ zerstört wurde. In Klammern wurden die auf ganzzahlige Aminosäurereste pro Peptid gerundeten Werte angegeben.

Peptid	34-AC 1	34-AC 2	34-AC 3	37-AC 1
Pos.	1-22	23-30	136-152	337-353
Asx	2,3 (2)	1,3 (1)	4,0 (4)	4,1 (4)
Thr	1,6 (2)		1,9 (2)	2,8 (3)
Ser	2,4 (2)			2,2 (2)
Glx	1,3 (1)	1,8 (2)	1,1 (1)	
Pro	2,1 (2)	1,9 (2)	1,9 (2)	0,9 (1)
Gly			1,3 (1)	1,2 (1)
Ala	2,2 (2)	1,0 (1)		
Val			1,7 (2)	0,8 (1)
Met				- (1)
Ile	1,7 (2)		1,7 (2)	
Leu	3,7 (4)	1,0 (1)		1,3 (1)
Tyr				0,9 (1)
Phe	1,0 (1)			
Lys	2,1 (2)		2,0 (2)	
His	1,1 (1)			
Arg	0,9 (1)	0,9 (1)	0,9 (1)	1,7 (2)

b) Trypsin-Spaltung

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie von d-Tn 34 und d-Tn 37 bleibt ein größerer Prozentsatz (bis zu 60 %) von d-Tn 34 und ein kleinerer (ca. 20 %) von d-Tn 37 irreversibel an CM-Sepharose CL-6B gebunden. Dieser Proteinanteil, der auch nicht durch hohe NaCl-Konzentration (2 M) abgelöst werden konnte, sollte nicht verworfen werden. Es wurde daher versucht, das gebundene Peptidgemisch aus d-Tn 34 und d-Tn 37 direkt am Ionenaustauscher mit Trypsin zu spalten. Man konnte erwarten, daß bei dem am Ionenaustauscher gebundenen Protein möglicherweise nicht alle potentiellen Trypsin-Spaltstellen für das Enzym zugänglich sein würden.

Für den Versuch wurden 10 ml des verwendeten Ionenaustauschers, die ca. 11 mg Gemisch d-Tn 34 und d-Tn 37 gebunden enthielten, nach Äquilibrieren mit (NH₄)HCO₃-Puffer, pH 8,0, mit insgesamt 0,22 mg Trypsin versetzt und unter leichtem Rühren inkubiert. Das Trypsin wurde in zwei Portionen zugefügt, die zweite Hälfte nach zwei Stunden. Nach

fünf Stunden Inkubation wurde zur Desorption der Peptide NaCl (ca. 2 M) zugefügt. Nach Abnutschen und Waschen des Gels mit zwei Gelvolumina $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ -Puffer wurde mit Eisessig angesäuert, das Gemisch am Rotationsverdampfer eingengt und danach über Sephadex G-10 entsalzt. Das lyophilisierte Peptidgemisch wurde dann durch HPLC mit dem Acetat-System getrennt (Abb. 27).

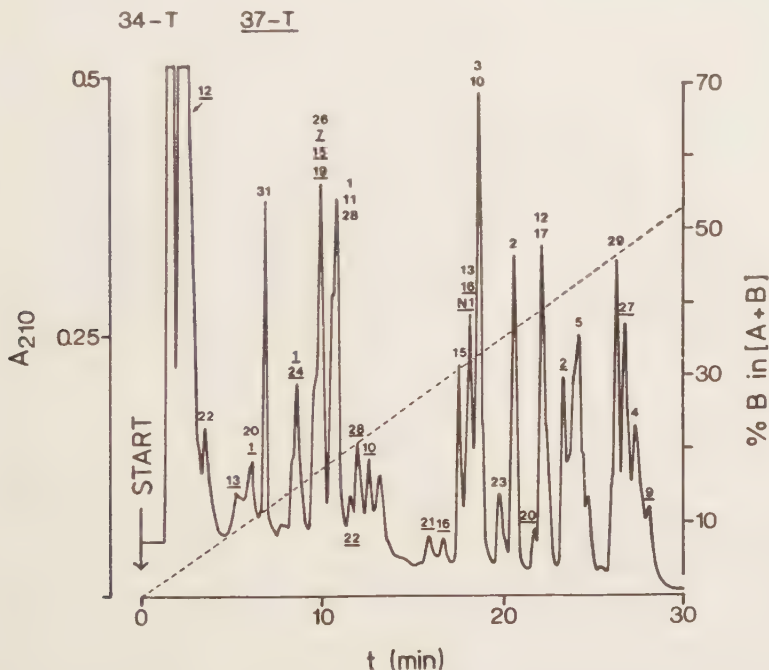


Abb. 27:

HPLC der tryptischen Peptide, die aus der Spaltung des am Ionenaustauscher gebundenen Gemisches von d-Tn 34 und d-Tn 37 hervorgingen.

Peptide aus d-Tn 37 wurden durch Unterstreichen der entsprechenden Nummern gekennzeichnet. Säule: RP 18 (Hibar, Fa. Merck); Acetat-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min. Das Peptidgemisch wurde in 200 µl eines Gemisches von 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0, und Ameisensäure (9 : 1) aufgenommen und zweimal je 100 µl auf die Säule aufgetragen.

Wie das Elutionsprofil zeigt, war das am Ionenaustauscher gebundene Material tatsächlich gespalten und die entstandenen Peptide abgelöst worden. Durch N-Terminus-Bestimmung eines aliquoten Teils der Gipfel-fractionen wurde ihre Reinheit geprüft und bei den Fraktionen, die

ein Gemisch darstellten, die Anzahl der Peptide, die diese enthielten, bestimmt. Elf Fraktionen enthielten saubere Peptide, eine enthielt zwei Peptide in so unterschiedlichem Mengenverhältnis, daß beide gleichzeitig sequenziert werden konnten (34-T 3 und 34-T 10). Die übrigen wurden durch Rechromatographie über die Vydac-Säule im TFA-System aufgetrennt (Abb. 28).

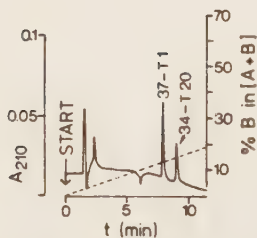


Abb. 28 a

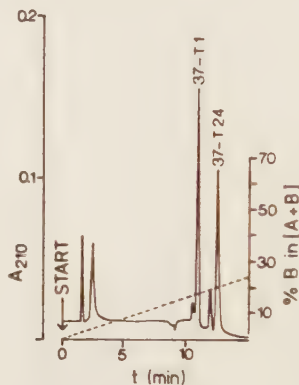


Abb. 28 b

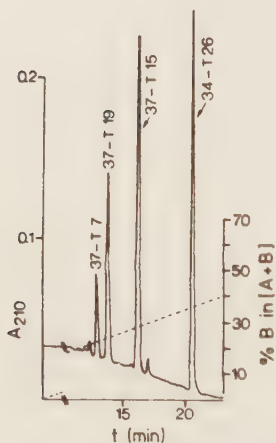


Abb. 28 c

Abb. 28:

HPLC zur Nachtrennung von tryptischen Peptiden, die beim ersten Trennversuch (Abb. 27) mit der Hibar-Säule der Fa. Merck bei Verwendung des Acetat-Systems in jeweils einem Gipfel eluiert wurden.

Säule: Vydac TP/RP (Fa. Chrompack); TFA-System; Gradient: 0-70 % B in (A+B)/40 min.

a) 34-T 20, 37-T 1; b) 37-T 1, 37-T 24;

c) 34-T 26, 37-T 7, 37-T 15, 37-T 19;

d) 34-T 1, 34-T 11, 34-T 28; e) 34-T 13,

37-T 16, 37-T-N 1; f) 34-T 12, 34-T 17.

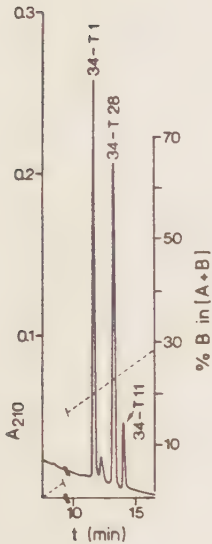


Abb. 28 d

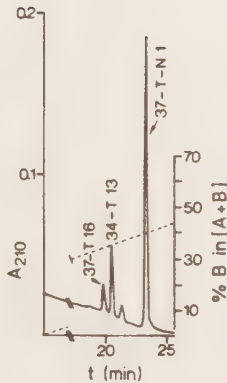


Abb. 28 e

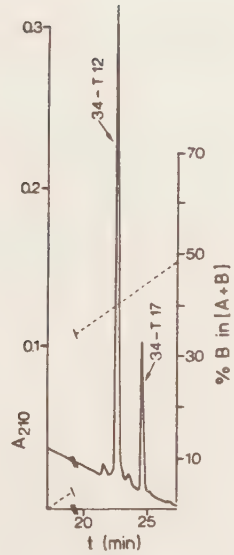


Abb. 28 f

Folgende Peptide, die d-Tn 34 zuzuordnen sind, wurden gefunden (neue Peptide durch unterstrichene Peptidbezeichnung gekennzeichnet):

34-T 1 (Pos. 1-8):

Thr-Ile-Ala-Asp-His-Gln-Ala-Arg

34-T 2 (Pos. 15-32):

Lys-Leu-Thr-Ser-Leu-Ser-Pro-Asp-Pro-Leu-Pro-

34-T 3 (Pos. 16-32):

Leu-Thr-Ser-Leu-Ser-Pro-Asp-Pro-Leu-Pro-

34-T 4 (Pos. 33-41):

Leu-Lys-Gly-Val-Gly-Phe-Leu-Pro-

34-T 5 (Pos. 35-41):

Gly-Val-Gly-Phe-Leu-

34-T 10 (Pos. 118-126):

Phe-Val-Pro-Ala-Glu-Thr-Ile-Asn-Arg

34-T 11 (Pos. 127-132):

Ala-Leu-Lys-Val-Asp-Lys

34-T 12 (Pos. 127-146):

Ala-Leu-Lys-Val-Asp-Lys-Ile-Ser-Asp-Pro-Asn-Lys-Asp-Thr-Val-

34-T 13 (Pos. 130-138):

Val-Asp-Lys-Ile-Ser-Asp-Pro-Asn-Lys

34-T 15 (Pos. 133-146):

Ile-Ser-Asp-Pro-Asn-Lys-Asp-Thr-

34-T 17 (Pos. 147-161):

Thr-Gly-Asn-Ile-Arg-Asp-Pro-Glu-Tyr-Asn-Val-Ala-

34-T 20 (Pos. 189-192):

Ile-Lys-Asp-Arg

34-T 22 (Pos. 208-212):

Tyr-Asp-Cys-Glu-Arg

34-T 23 (Pos. 213-219):

Leu-Ser-Val-Gly-Leu-Gln-

34-T 26 (Pos. 257-267):

Asp-Ile-Asn-Asp-Cys-Ser-

34-T 28 (Pos. 268-271):

Trp-Arg-Glu-Arg

34-T 29 (Pos. 272-287):

Ile-Leu-Asp-Ala-Ile-His-Thr-Gly-

34-T 31 (Pos. 330-336):

Ile-His-Asp-Ala-Asp-Gly-Arg

Im folgenden sollen nur diejenigen Peptide besprochen werden, die erst nach Trypsinolyse des am Ionenaustauscher gebundenen d-Tn 34 gefunden wurden und nicht aus der Spaltung des gelösten d-Tn 34 bekannt waren.

34-T 3 (Pos. 16-32) besitzt im Gegensatz zu Peptid 34-T 2 N-terminal einen Leucinrest. Dies bedeutet, daß grundsätzlich sowohl nach Lys(14) als auch nach Lys(15) Spaltung möglich ist. Das Peptid 34-T 2, das N-terminal noch einen Lysinrest enthält, kann vielleicht damit erklärt werden, daß nach erfolgter Spaltung zwischen Lys(14) und Lys(15) das einzelne Lysin nicht mehr abgespalten werden kann. Das Vorkommen beider Peptide belegt jedenfalls eindeutig die unmittelbare Aufeinanderfolge zweier Lysinreste in diesem Sequenzabschnitt. Auch bei Peptid 34-T 3 fand wie bei Peptid 34-T 2 keine Spaltung zwischen Arg(29) und Asp(30) statt.

34-T 4 (Pos. 33-41) ist ein Peptid, das sich von 34-T 5 dadurch unterscheidet, daß es N-terminal um zwei Aminosäurereste verlängert ist, weil zwischen Lys(34) und Gly(35) nicht gespalten wurde. Zum Teil wurde jedoch auch bei dem am Ionenaustauscher gebundenen d-Tn 34 zwischen Lys(34) und Gly(35) gespalten, wie die Entstehung von Peptid 34-T 5 zeigt. Möglicherweise kommt es hier wie bei Peptidpaar 34-T 2 / 34-T 3 auf die zeitliche Reihenfolge der Spaltung an. Das unvollständig gespaltene Peptid 34-T 4 schließt direkt an 34-T 2 bzw. 34-T 3 an und schließt die Lücke zwischen 34-T 3 und 34-T 5.

Bei Peptid 34-T 12 (Pos. 127-146) fand sowohl zwischen Lys(132) und Ile(133) als auch zwischen Lys(138) und Asp(139) keine Spaltung statt. Daß diese unter den Bedingungen des gelösten d-Tn 34 möglich ist, zeigen die Peptide 34-T 11 und 34-T 14.

Bei Peptid 34-T 13 (Pos. 130-138) fand zwischen Lys(132) und Ile(133) wie bei 34-T 12 keine Spaltung statt, dagegen zwischen Lys(138) und Asp(139). Die Peptide 34-T 12 und 34-T 13 vergrößern die Überlappung zwischen 34-SP 4 und 34-T 14 bzw. 34-T 15 von nur 3 Aminosäuren um 6 bzw. um 3 Aminosäuren.

Bei 34-T 28 (Pos. 268-271) fand zwischen Arg(269) und Glu(270) keine Spaltung statt. Bei der Trypsin-Spaltung von gelöstem d-Tn 34 wurde dagegen das Dipeptid 34-T 27 freigesetzt. Die Bindung Arg(269)-Glu(270) kann also prinzipiell gespalten werden.

An Peptiden, die dem Fragment d-Tn 37 zuzuordnen sind, wurden folgende gefunden (neue Peptide durch unterstrichene Peptidbezeichnung gekennzeichnet):

37-T 1 (Pos. 337-338):

Tyr-Arg

37-T 2 (Pos. 339-352):

Thr-Asn-Pro-Gly-Val-Met-Asp-Asp-Thr-Ser-Thr-Ser-Leu-Arg

37-T 7 (Pos. 392-395):

Val-Thr-Val-Arg

37-T 9 (Pos. 408-420):

Asp-Ser-Leu-Leu-Glu-Leu-Ser-

37-T 10 (Pos. 421-426):

Gly-His-Ile-Gln-Val-

37-T 12 (Pos. 447-451):

Thr-Gly-Glu-Ala-Arg

37-T 13 (Pos. 452-456):

Glu-Thr-Cys-Val-Arg

37-T 15 (Pos. 463-469):

Tyr-Asp-Glu-Leu-Gly-Asn-

37-T 16 (Pos. 470-476):

Leu-Leu-Leu-Glu-Glu-

37-T 19 (Pos. 488-493):

Arg-Leu-Glu-Pro-Gly-

37-T 20 (Pos. 488-498):

Arg-Leu-Glu-Pro-Gly-Lys-Asn-Val-Leu-Val-

37-T 21 (Pos. 494-498):

Asn-Val-Leu-Val-Arg

37-T 22 (Pos. 499-509):

Ala-Ser-Gly-Asp-Ser-Ser-Val-

37-T 24 (Pos. 583-589):

Asp-Gln-Lys-Tyr-Pro-Asp-

37-T 27 (Pos. 591-603):

Ala-Met-Gly-Tyr-Pro-Phe-Asp-Arg-Pro-Ile-Gln-Val-Arg

37-T 28 (Pos. 604-609):

Thr-Pro-Ser-Gln-Phe-

37-T-N 1 (Pos. 429-446):

Tyr-Glu-His-Leu-Asp-His-

Peptid 37-T 12 (Pos. 447-451) schließt die Lücke zwischen den Peptiden 37-T 11 und 37-T 13, wie sich durch die Überlappungen von 37-T 11 und 37-T 12 durch 37-SP 4 und von 37-T 12 und 37-T 13 durch Peptid AP 6 zeigt.

Peptid 37-T 20 (Pos. 488-498) besitzt wie 37-T 19 N-terminal einen Argininrest. Es wurde kein Peptid gefunden, das mit Leu(489) beginnt. Bei 37-T 20 fand aber zwischen Lys(493) und Asn(494) keine Spaltung statt, so daß durch dieses Peptid der unmittelbare Anschluß von 37-T 21 an 37-T 19 gezeigt wird. Ebenso wird die Überlappung der beiden Peptide 37-SP 8 und 37-SP 9 durch 37-T 19 weiter abgesichert.

Tab. 9:

Aminosäurezusammensetzung der tryptischen Peptide, die nur nach Spaltung des am Ionenaustauscher gebundenen Gemisches von d-Tn 34 und d-Tn 37 erhalten wurden. 24-Stunden-Hydrolysen; Tryptophan wurde nicht bestimmt. Von Peptid 34-T 3 liegt keine AS-Analyse vor, da dieses Peptid nur im Gemisch mit Peptid 34-T 10 vorlag. In Klammern wurden die auf ganzzahlige Aminosäurereste pro Peptid gerundeten Werte angegeben.

Peptid	34-T 4	34-T 12	34-T 13	34-T 28	37-T 12	37-T 20
Pos.	33-41	127-146	130-138	268-271	447-451	488-498
Asx		4,0 (4)	2,6 (3)			1,1 (1)
Thr		1,1 (1)			0,8 (1)	
Ser		1,3 (1)	1,2 (1)			
Glx		1,2 (1)		1,1 (1)	1,0 (1)	1,2 (1)
Pro	0,9 (1)	1,8 (2)	0,9 (1)			1,1 (1)
Gly	2,4 (2)				1,2 (1)	1,2 (1)
Ala		0,7 (1)			0,7 (1)	
Val	1,2 (1)	2,6 (3)	0,8 (1)			1,6 (2)
Met						
Ile		1,7 (2)	1,0 (1)			
Leu	1,9 (2)	0,9 (1)				1,7 (2)
Tyr						
Phe	1,0 (1)					
Lys	0,9 (1)	4,2 (4)	2,1 (2)			0,8 (1)
His						
Arg	0,8 (1)			1,9 (2)	1,2 (1)	1,8 (2)

Durch die Spaltung der am Ionenaustauscher gebundenen Bruchstücke d-Tn 34 und d-Tn 37 konnten somit fünf neue 34-T-Peptide und zwei neue 37-T-Peptide isoliert werden. Einige dieser Peptide sind durch ungespaltene Lys-X- bzw. Arg-X-Bindungen gekennzeichnet. Die Bindung der Bruchstücke d-Tn 34 und d-Tn 37 am Ionenaustauscher verhinderte möglicherweise die Spaltung dieser Bindungen aus sterischen Gründen. Dafür spricht auch die Tatsache, daß sowohl bei d-Tn 34 als auch bei d-Tn 37 nach Spaltung am Ionenaustauscher weniger Peptide isoliert werden konnten (ca. 70 % in beiden Fällen) als nach Spaltung in Lösung.

7. Volletändige Primärstruktur der Untereinheit d

Die vollständige Sequenz der UE d, wie sie sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sowie den von SCHARTAU und EYERLE sequenzierten Teilen zusammensetzt, ist in Abbildung 29 dargestellt. Abbildung 30 zeigt in übersichtlicher Form den Beitrag verschiedener Proteinspaltmethoden an der Aufklärung der Gesamtsequenz. Die UE d besteht aus insgesamt 627 Aminosäureresten. Die molare Masse errechnet sich zu 72232 Da. Dies stimmt gut überein mit den früher durch SDS-Gelelektrophorese und analytische Ultrazentrifugation (Sedimentationsgleichgewicht) bestimmten molaren Masse von 73000 (SCHNEIDER et al., 1977). Die aus der Sequenz abgeleiteten molaren Massen von 38149 Da für d-Tn 34 und von 34047 Da für d-Tn 37 verhalten sich dagegen umgekehrt wie die aus der SDS-Gelelektrophorese bestimmten molaren Massen.

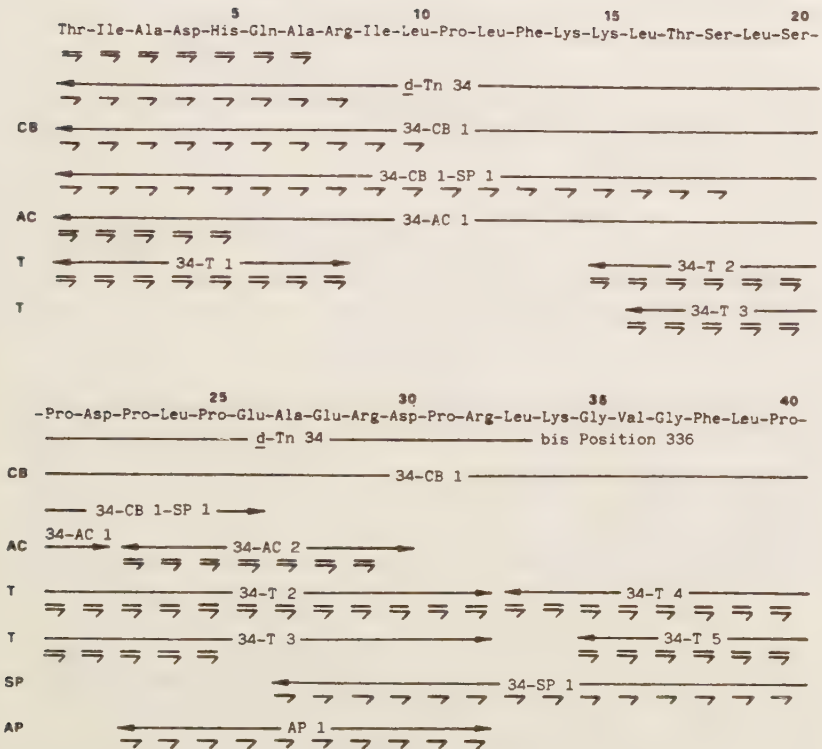
Die Aminosäurezusammensetzung, die sich aus der Sequenz ergibt, zeigt Tabelle 10. Die früher veröffentlichte Analyse (MARKL et al., 1979) muß korrigiert werden, vor allem für Asx, Ser, Ala, Gly, Tyr und Arg.

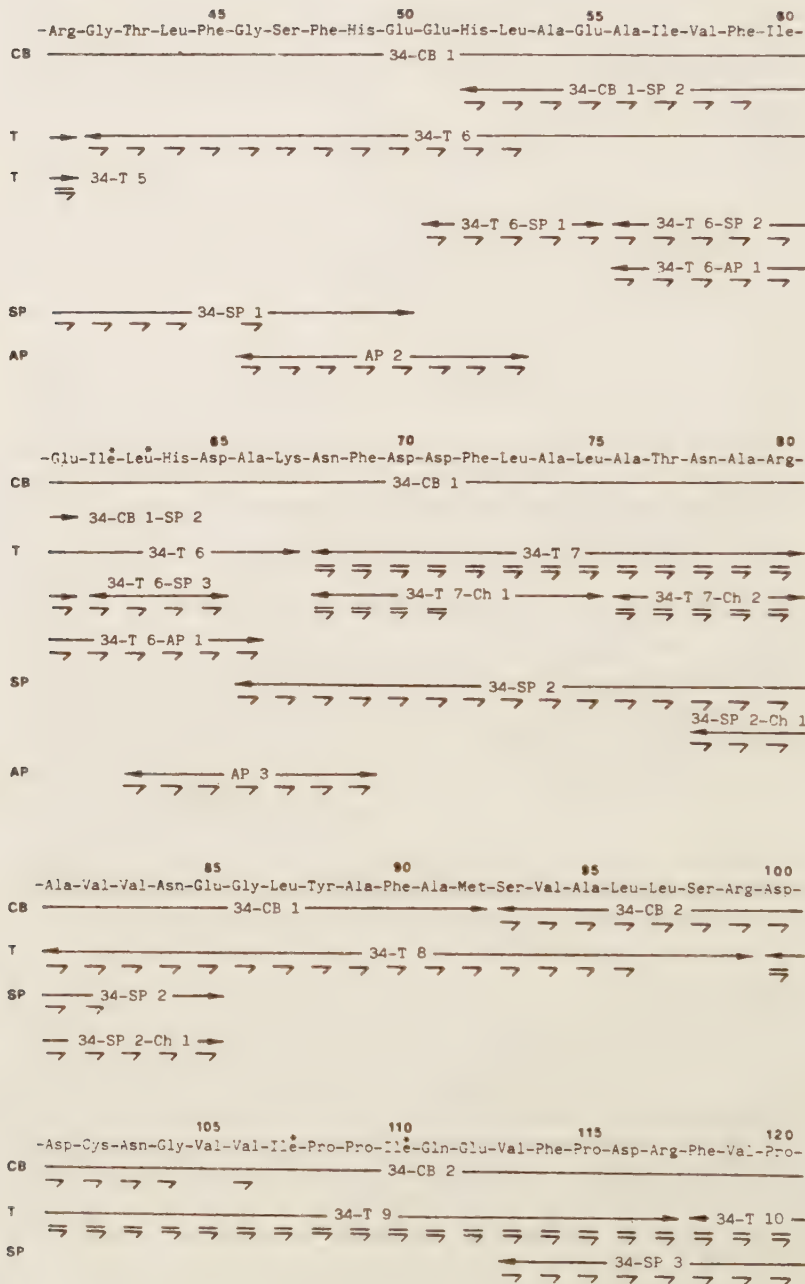
Cys	7	Met	14
Asp	47	Ile	30
Asn	29	Leu	52
Thr	25	Ile oder Leu	10
Ser	36	Tyr	31
Glu	45	Phe	27
Gln	21	Lys	31
Pro	35	His	29
Gly	39	Arg	42
Ala	33	Trp	5
Val	39		

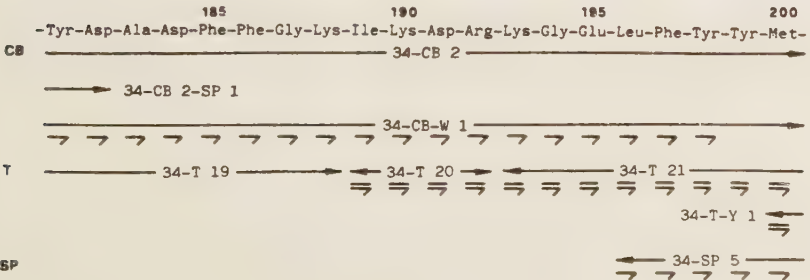
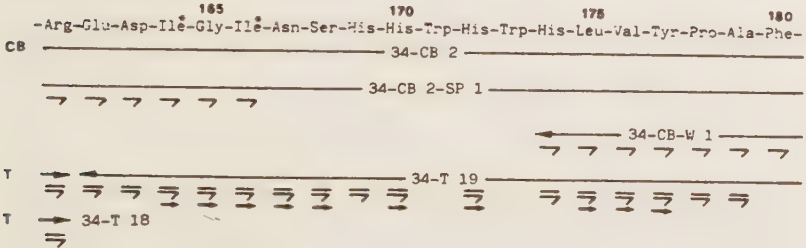
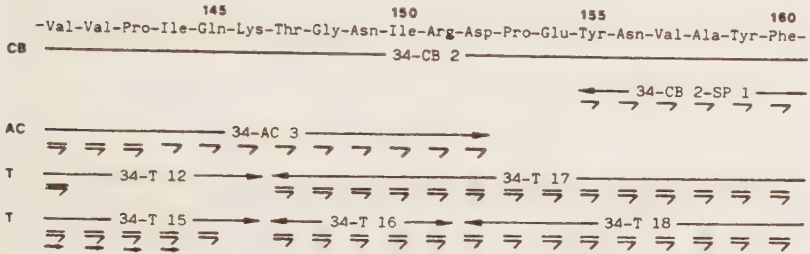
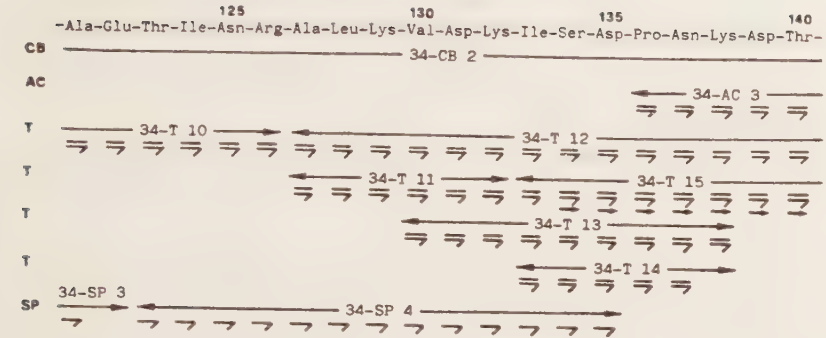
Tab. 10:
Aus der Sequenz (Abb. 29) abgeleitete Aminosäurezusammensetzung der UE d des Hämocyanins von Eurypelma californicum. In zehn Fällen konnte nicht zwischen den Aminosäuren Isoleucin und Leucin unterschieden werden.

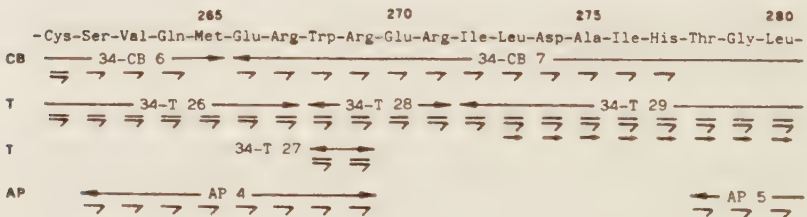
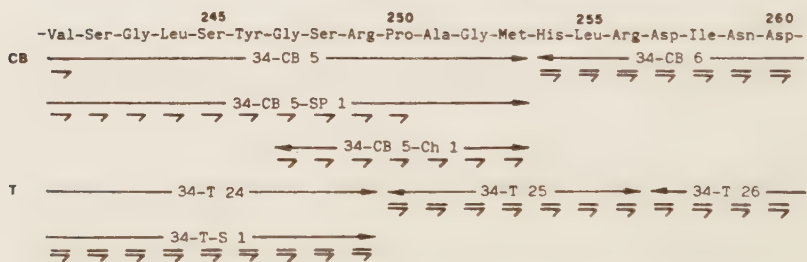
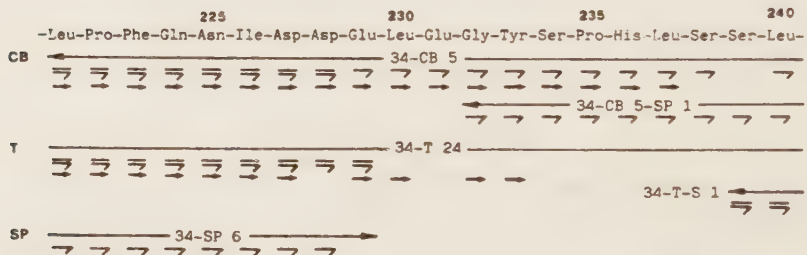
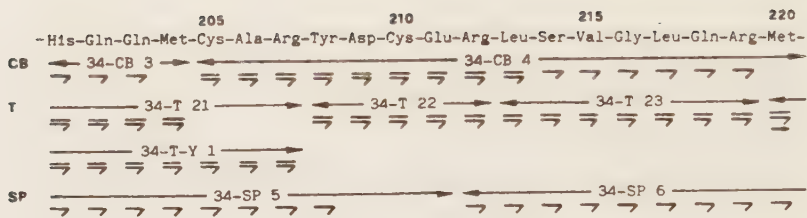
In keinem Fall konnte ein kohlenhydrat-haltiges Peptid nachgewiesen werden. Dies hätte sich entweder durch eine Sequenzlücke bemerkbar gemacht (Nicht-Extrahierbarkeit des entsprechenden AS-Derivates) oder durch eine DABTH-Aminosäure mit ungewöhnlichem chromatographischem Verhalten.

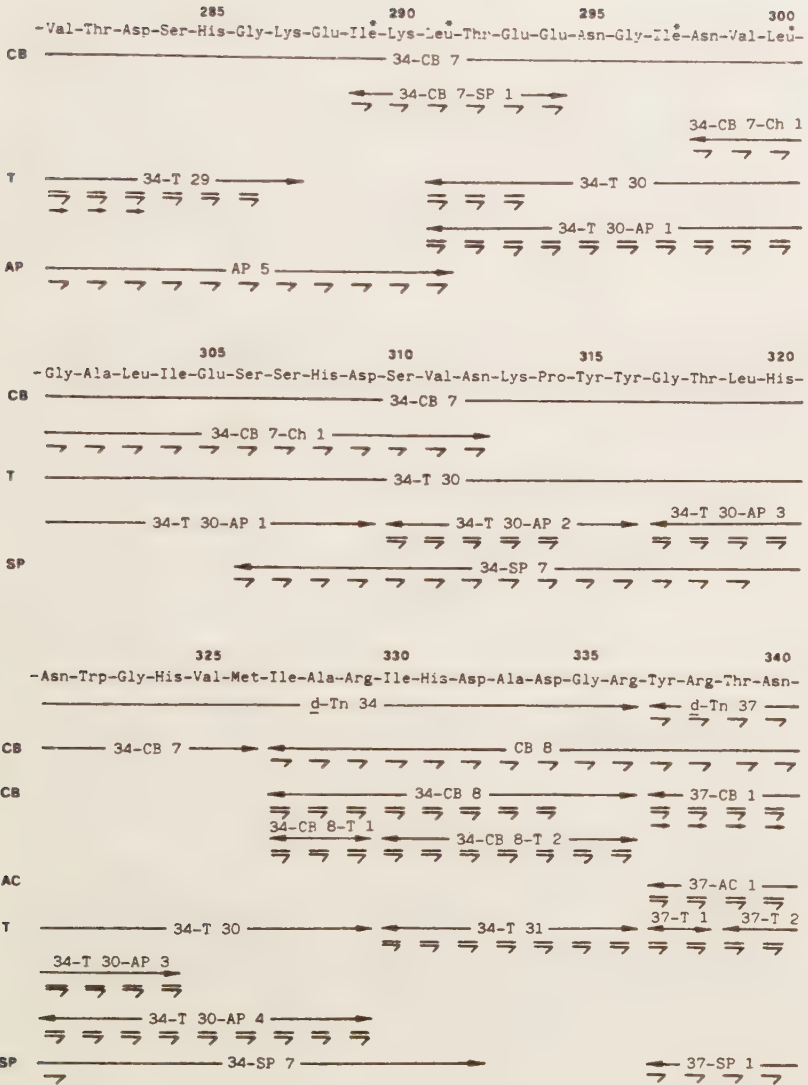
Abb. 29:

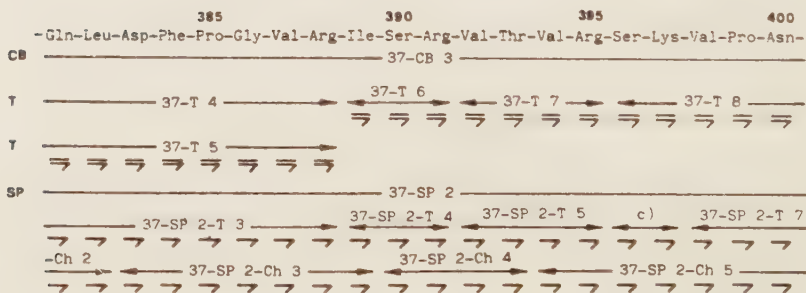
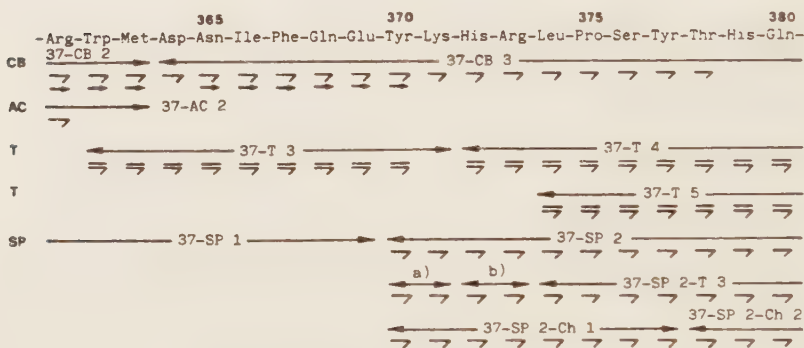
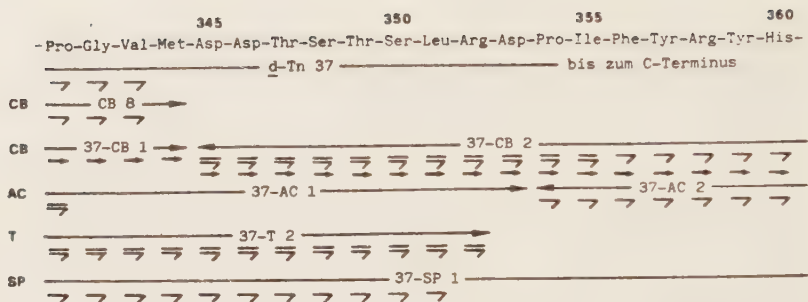


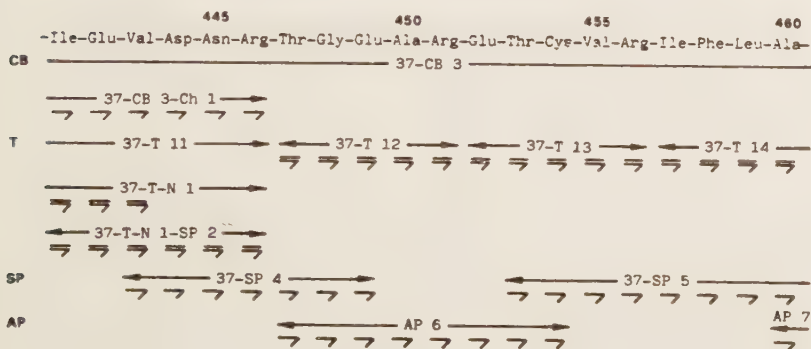
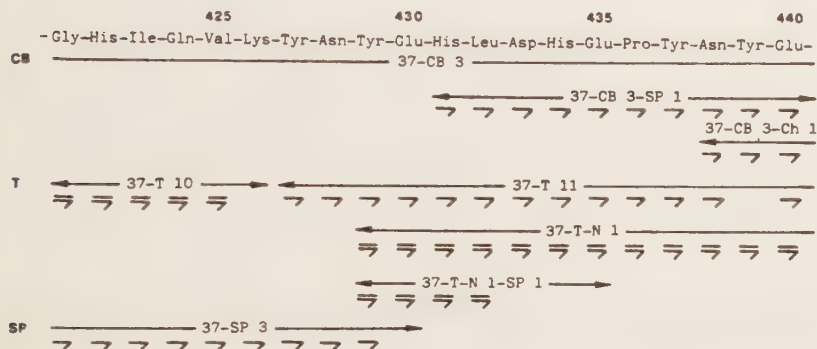
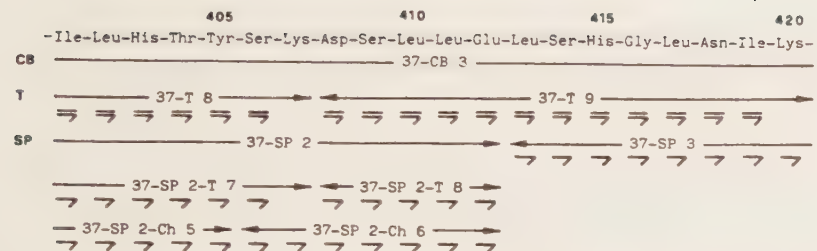


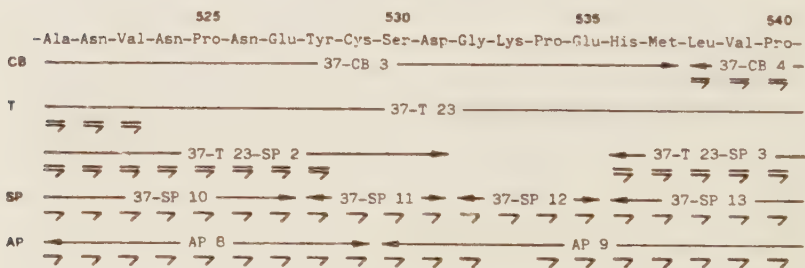
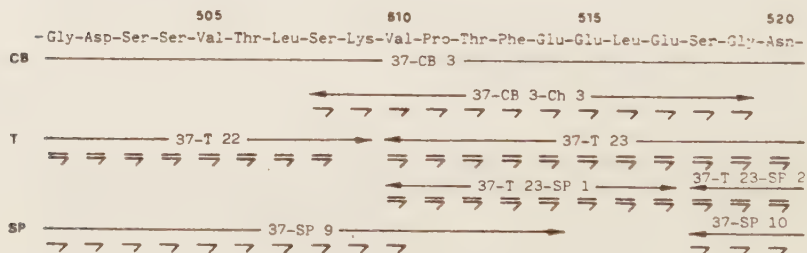
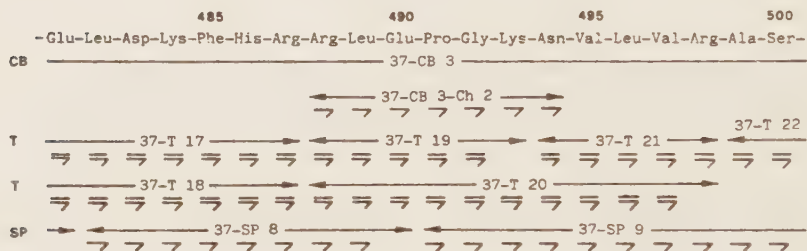
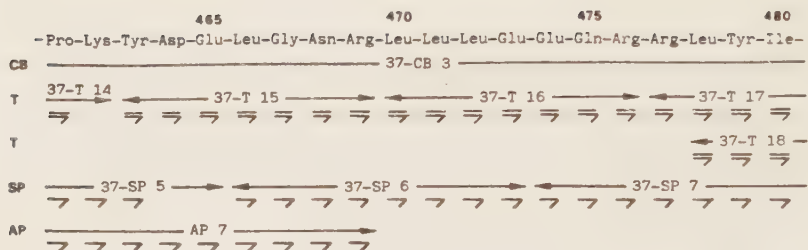


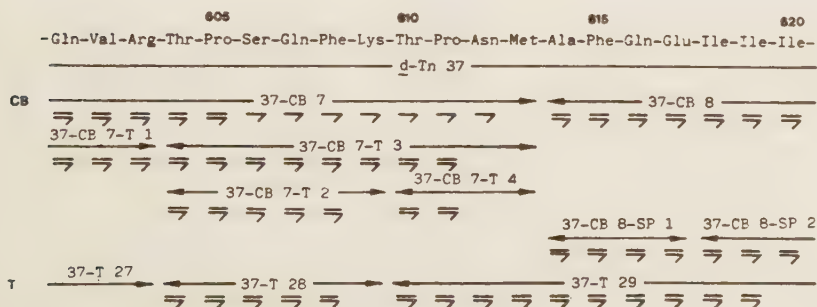
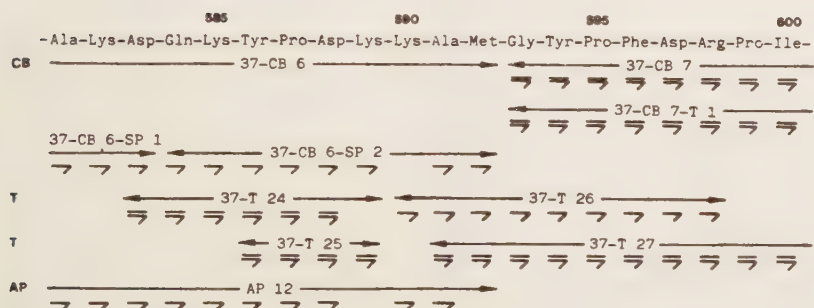
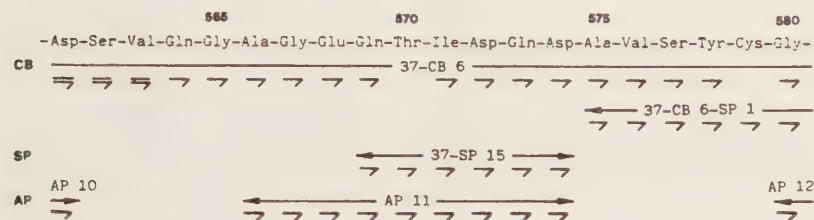
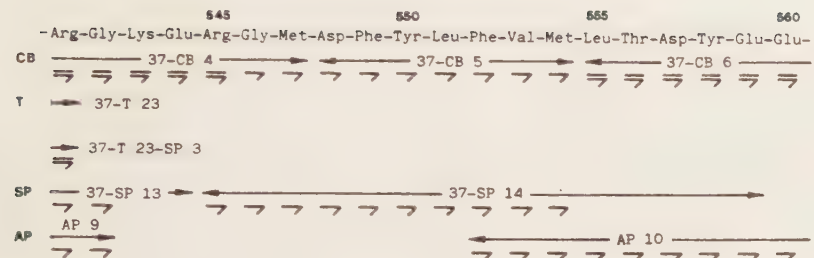












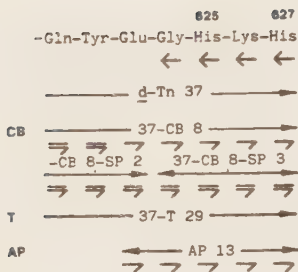


Abb. 29:

Vollständige Aminosäure-Sequenz der Untereinheit d des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*.

↔ zeigt die Länge der Peptide an, die zur Sequenzaufklärung herangezogen wurden;
 ↗ kennzeichnet Aminosäurereste, die durch manuelle Sequenzierung identifiziert wurden;
 ↘ kennzeichnet Aminosäurereste, die im Rahmen dieser Arbeit durch manuelle Sequenzierung identifiziert wurden; → weist auf Aminosäurereste hin, die nach Abbau mit dem Festphasen-Sequenator identifiziert wurden; ← bedeutet Abbau durch Carboxypeptidase Y.
 Ile* könnte auch ein Leucin-Rest sein, Leu* auch ein Isoleucin-Rest.

a) = 37-SP 2-T 1; b) = 37-SP 2-T 2; c) = 37-SP 2-T 6.





b

Abb. 30:

Beitrag verschiedener Protein-Spaltmethoden und der daraus entstandenen Peptide zur Aufklärung der Gesamtsequenz der Untereinheit d.

Die Anzahl der Abbauschritte bei den einzelnen Peptiden ist durch Linierung bzw. Karierung dieser Bereiche dargestellt. Sequenzen, die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt wurden, sind durch Karierung hervorgehoben.

a) d-Tn 34; b) d-Tn 37.

II. Untersuchungen zur Sekundärstruktur von Vogelspinnen-Hämocyanin

1. Computerisierte Chou/Fasman-Methode an den Untereinheiten d und e

Nach heutigem Wissensstand wird sowohl die Sekundärstruktur als auch die Tertiärstruktur eines Proteins von seiner Primärstruktur bestimmt (ANFINSEN, 1973). Neben Versuchen, sogar Teile der Tertiärstruktur aus der Primärstruktur abzuleiten (LEVITT und WARSHEL, 1975), werden schon länger Versuche unternommen, die Sekundärstruktur aus der Primärstruktur vorherzusagen (Zusammenfassung: SCHULZ und SCHIRMER, 1979). Ein Teil der verwendeten Methoden beruht dabei auf der Tatsache, daß den verschiedenen Aminosäureresten in einem Protein eine unterschiedliche Tendenz zur Ausbildung einer bestimmten Sekundärstruktur zukommt. So kommen Aminosäuren mit einer verzweigten oder ausladenden Seitenkette (Val, Ile und Thr) oder einem aromatischen Ring (Phe, Tyr und Trp) sehr häufig in β -Faltblättern vor. Die übrigen Aminosäuren kommen oft in α -Helices vor, mit Ausnahme jener mit kurzen polaren Seitenketten (Ser, Asp und Asn) oder besonderer Struktur (Gly und Pro), die oft an der Bildung von Reverse Turns beteiligt sind. Nur Arginin zeigt keine Tendenz, vorzugsweise in einer bestimmten Sekundärstruktur vorzukommen (LEVITT, 1978). Diese unterschiedliche Tendenz, eine bestimmte Sekundärstruktur auszubilden, war bestimmt worden durch das Auswerten der Tertiärstrukturen von Proteinen, die sowohl röntgenstruktur-analytisch als auch sequenz-analytisch untersucht worden waren (CHOU und FASMAN, 1974). Diese durch Vergleich der Tertiärstruktur mit der Primärstruktur mehrerer Proteine gewonnenen Daten ermöglichen nun eine Sekundärstrukturvorhersage aus der Primärstruktur. Die zu erreichende Genauigkeit solcher Vorhersagen wird dabei von verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt (SCHULZ und SCHIRMER, 1979; NISHIKAWA, 1983).

Sehr oft werden Sekundärstrukturen nach den von CHOU und FASMAN (1978) entwickelten Regeln vorhergesagt. Diese beruhen auf den empirisch bestimmten Parametern (siehe oben) P_{α} und P_{β} der Aminosäuren, die ein Maß für die Tendenz sind, die jeweiligen Strukturen auszubilden. Dabei muß bei einem Protein über einen Mindest-Bereich hinweg ohne Störfaktoren (z.B. Helixbrecher) eine durchschnittlich positive Tendenz vorhanden sein, einen bestimmten Sekundärstruktur-Typ auszubilden.

Da im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried ein von NISHIKAWA (1983) modifiziertes Rechenprogramm nach CHOU und FASMAN zur Verfügung stand, wurde eine Sekundärstrukturvorhersage bei den Untereinheiten d und e durchgeführt, deren vollständige Primärstruktur nun vorlag. Das Ziel war, die prozentualen Strukturanteile in beiden Untereinheiten und deren Anordnung abzuschätzen und zu vergleichen. Das verwendete Rechenprogramm für die Sekundärstrukturvorhersagen besteht aus zwei Abschnitten. Zunächst wurde eine vorläufige Vorhersage durchgeführt, bei der Überlappungen zwischen verschiedenen Sekundärstruktur-Bereichen nicht aufgelöst werden. In einem zweiten Schritt wurden dann Überlappungen nach bestimmten Regeln aufgelöst und das endgültige Ergebnis berechnet. Nach CHOU/FASMAN werden dabei folgende Sekundärstrukturen unterschieden: α -Helix, β -Faltblatt, Reverse Turn und Coil.

Die Abbildung 31 zeigt in tabellarischer Form die Sekundärstrukturvorhersagen für die Untereinheiten d und e. Darin sind α -Helix, β -Faltblatt und Reverse Turn durch Symbole gekennzeichnet. Nicht gekennzeichnete AS-Positionen werden von der Coil-Struktur eingenommen. Es wurde sowohl die vorläufige Vorhersage mit Überlappungen der Strukturanteile wiedergegeben, als auch die endgültige mit Auflösung der Überlappungen. Sekundärstrukturanteile, die nur mit relativ geringer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden können, sind in der Abbildung durch in Klammern gesetzte Symbole wiedergegeben. Die Tabelle 11 gibt die prozentualen Sekundärstruktur-Anteile für beide Untereinheiten wieder, und zwar getrennt nach Strukturanteilen mit hoher Wahrscheinlichkeit und nach Strukturanteilen mit hoher plus niedriger Wahrscheinlichkeit. Vergleicht man die Werte der Spalten für hohe plus niedere Wahrscheinlichkeit mit den Werten der Spalten für hohe Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer bestimmten Sekundärstruktur, so findet man sehr große Unterschiede im α -Helix-Gehalt und im Reverse-Turn-Gehalt, dagegen annähernd gleiche Werte bei der β -Faltblattstruktur. Die Angaben für die Coil-Struktur wurden aus der Differenz der Gesamtstruktur-Anteile und der Summe aus α -Helix, β -Faltblatt und Reverse Turn berechnet.

Vergleicht man die beiden Untereinheiten d und e in ihrem Gehalt an Strukturanteilen, so findet man bei der Untereinheit d bei Einbeziehung der Strukturanteile mit geringerer Wahrscheinlichkeit einen um 6,7 % höheren α -Helix-Gehalt und einen um 2,8 % geringeren β -Faltblatt-Anteil. Der Gehalt an Reverse Turns ist bei beiden Untereinheiten

annähernd gleich. Vergleicht man die Strukturanteile, die mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden, so findet man bei der Untereinheit d einen um 0,9 % niedrigeren α -Helix-Anteil, einen um 1,6 % niedrigeren β -Faltblatt-Anteil und einen um 1,5 % höheren Reverse-Turn-Gehalt. Beide Untereinheiten scheinen also annähernd gleiche Anteile der verschiedenen Strukturen zu besitzen, wobei mit Einbeziehung der Strukturabschnitte mit niedriger Wahrscheinlichkeit der α -Helix-Anteil am höchsten ist, gefolgt von β -Faltblatt und Reverse Turn zu etwa gleichen Teilen.

Die vorliegenden Primärstrukturen zweier stark homologer Untereinheiten bieten die interessante Möglichkeit, die Sekundärstruktur-Vorhersagen für beide Untereinheiten zu vergleichen. Bestimmt man die Anzahl der Aminosäure-Positionen, für die in beiden Untereinheiten dieselbe Sekundärstruktur vorhergesagt wurde, ungeachtet hoher oder niedriger Wahrscheinlichkeit, so erhält man 143 gemeinsame Positionen für α -Helix, 57 für β -Faltblatt und 63 für Reverse Turn. Jeweils ca. die Hälfte der Positionen der vorhergesagten Strukturanteile stimmen also in beiden Untereinheiten überein. Solche Bereiche könnten mit höherer Wahrscheinlichkeit die vorhergesagte Struktur besitzen.

Die Anordnung der vorhergesagten Strukturanteile in der Polypeptidkette d zeigt die Abbildung 32 in übersichtlicher Form. Betrachtet man die Verteilung von α -Helix und β -Faltblatt, so fällt auf, daß für den N-terminalen Bereich der Untereinheit etwa bis Pos. 100 vorwiegend α -helikal vorausgesagt wird, während die Bereiche von Pos. 100-205 und von Pos. 295-425 reich an β -Faltblatt-Strukturen sein sollen. Diese Häufung von α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen in den genannten Bereichen findet man in ähnlicher Weise bei der UE e. Auffällig ist der bei beiden Untereinheiten vorhergesagte Reverse-Turn-Bereich in Pos. 335-353 (Abb. 31).

Der Verlauf von P_α als Maß zur Ausbildung von α -Helix und P_β als Maß zur Ausbildung von β -Faltblatt (Konformationsprofil) wurde für die Untereinheit d aufgetragen (Abb. 32). Dazu wurde jeweils der mittlere P_α - bzw. P_β -Wert für ein Tetrapeptid berechnet. Die Darstellung, die somit auf einem Teil der Vorhersageregeln beruht, läßt eine zum Teil gute Übereinstimmung von Computer-Vorhersage nach der modifizierten Chou/Fasman-Methode und dem Verlauf des Konformationsprofils erkennen. Einige Details sollen in der Diskussion besprochen

werden. In die Abbildung wurde zusätzlich, die aufgrund einer Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus interruptus-Hämocyanin (GAYKEMA et al., 1984) durch Sequenzvergleich mit Untereinheit d gewonnene Sekundärstruktur-Verteilung mitaufgenommen (siehe Diskussion).

Tab. 11:

Prozentuale Anteile verschiedener Sekundärstrukturen in den Untereinheiten d und e. Es wurden sowohl die Werte für Strukturanteile angegeben, die mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurden als auch diejenigen, die sich bei Einbeziehung der mit niederer Wahrscheinlichkeit vorhergesagten Strukturanteile ergeben.

	Untereinheit <u>d</u>		Untereinheit <u>e</u>	
	niedere + hohe Wahrscheinlichkeit	hohe Wahrscheinlichkeit	niedere + hohe Wahrscheinlichkeit	hohe Wahrscheinlichkeit
α -Helix	44,5	17,1	37,8	18,0
β -Faltblatt	20,1	20,1	22,9	21,7
Reverse Turn	19,6	9,2	19,0	7,7
Coil	15,8	53,6	20,3	52,6

Abb. 31:

UE <u>d</u>				1. Vorhersage	2. Vorhersage	UE <u>e</u>				1. Vorhersage	2. Vorhersage
1	THR	(H)	(H)	(H)	(H)	1	PRO	(H)	(H)	(H)	(H)
	ILE	(H)		(H)	(H)		ASP	(H)		(T)	(T)
	ALA	(H)		(H)	(H)		LYS	(H)		(T)	(T)
	ASP	(H)		(H)	(H)		GLN	(H)			
	HIS	(H)		(H)	(H)		LYS	(H)			
	GLN	(H)		(H)	(H)		GLN	(H)	B		B
	ALA	(H)		(H)	(H)		LEU	(H)	B		B
	ARG	(H)		(H)	(H)		ARG	(H)	B		B
	ILE	(H)		(H)	(H)		VAL	(H)	B		B
10	LEU	(H)		(H)	(H)	10	ILE	(H)	B		B
	PRO	(H)		(H)	(H)		SER	(H)	B		B
	LEU	(H)		(H)	(H)		LEU	(H)	B		B
	PHE	(H)		(H)	(H)		PHE	(H)	B		B
	LYS	(H)		(H)	(H)		GLU	(H)			
	LYS	(H)		(H)	(H)		HIS	(H)			
	LEU	(H)		(H)	(H)		MET	(H)			
	THR	(H)		(H)	(H)		THR	(H)			
	SER	(H)		(H)	(H)		SER	(H)			
	LEU	(H)		(H)	(H)		ILE	(H)			
20	SER					20	ASN				
	PRO		T		T		THR				
	ASP		T		T						
	PRO	(H)	(T)		(T)		PRO	(H)		(T)	(T)
	LEU	(H)	(T)		(T)		LEU	(H)			
	PRO	(H)			H		PRO	(H)	(T)		(T)
	GLU	(H)			H		ARG	(H)	T		T
	ALA	(H)			H		ASP	(H)	T		T
	GLU	(H)			H		GLN	(H)			(H)
	ARG	(H)			H		ILE	(H)			(H)
30	ASP				(H)		ARG	(H)			(H)
	PRO		T		T	30	ALA	(H)			(H)
	ARG		T		T		ARG	(H)			(H)
	LEU						LEU	(H)			(H)
	LYS						HIS	(H)			(H)
	GLY						HIS	(H)			(H)
	VAL						LEU	(H)			(H)
	GLY						GLY				
	PHE						ARG				
	LEU						LEU				
40	PRO		T		T		PRO		(T)		(T)
	ARG		T		T	40	GLN		(T)		(T)
	GLY		T		T		GLY		(T)		(T)
	THR						GLU	H			H
	LEU						LEU	H			H
	PHE						PHE	H			H
	GLY						SER	H	(T)		H
	SER	H			H		ASP	H	(T)		H
	PHE	H			H		PHE	H			H
	HIS	H			H		HIS	H			H
50	GLU	H			H		GLU	H			H
	GLU	H			H	50	GLU	H			H
	HIS	H			H		ASP	H			H

	LEU	H		H		LEU	H		H
	ALA	H		H		GLU	H		H
	GLU	H		H		GLU	H		H
	ALA	H		H		ALA	H		H
	ILE	H		H		THR	H		H
	VAL	H		H		GLU	H		H
	PHE	H		H		LEU	H		H
60	ILE	H		H		TYR	H		H
	GLU	H		H		LYS	H		H
	ILE	H		H		ILE	H		H
	LEU	H		H		LEU	H		H
	HIS	H		H		TYR	(H)		(H)
	ASP	H		H		THR	(H)		(H)
	ALA	H		H		ALA	(H)		(H)
	LYS	H		H		LYS	(H)		(H)
	ASN					ASP	(H)		(H)
	PHE	H	(T)	H		PHE	(H)		(H)
70	ASP	H	(T)	H		ASP	(H)		(H)
	ASP	H		H		70	GLU	(H)	(H)
	PHE	H		H			VAL	(H)	(H)
	LEU	H		H			ILE	(H)	(H)
	ALA	H		H			ASN	(H)	(H)
	LEU	H		H			LEU	(H)	(H)
	ALA	H		H			ALA	(H)	(H)
	THR	H		H			LYS	(H)	(H)
	ASN	(H)		(H)			GLN	(H)	(H)
	ALA	(H)		(H)			SER	(H)	(H)
80	ARG	(H)		(H)			LYS	(H)	(H)
	ALA	(H)		(H)		80	THR	(H)	(H)
	VAL	(H)		(H)			PHE	(H)	(H)
	VAL	(H)		(H)			VAL	(H)	(H)
	ASN	(H)		(H)			ASN		
	GLU	(H)	(T)	(H)			GLU	(H)	(T)
	GLY		(T)				GLY	(H)	(T)
	LEU						LEU	(H)	B
	TYR						PHE	(H)	B
	ALA	(H)		H			VAL	(H)	B
90	PHE	(H)		H			TYR	(H)	B
	ALA	(H)		H		90	HIS	(H)	B
	MET	(H)		H			VAL	(H)	B
	SER	(H)		H			SER	(H)	B
	VAL	(H)		H			VAL	(H)	B
	ALA	(H)		H			ALA	(H)	B
	LEU	(H)		H			LEU	(H)	B
	LEU	(H)		H			LEU	(H)	B
	SER	(H)		H			HIS	(H)	
	ARG	(H)	T	T			ARG	(H)	T
100	ASP	(H)	T	T			ASP	(H)	T
	ASP	(H)	T	T		100	ASP	(H)	T
	CYS		T	T			CYS	(H)	T
	ASN	B	T	B			LYS	(H)	(T)
	GLY	B	(T)	B			GLY		
	VAL	B		B			ILE	B	B
	VAL	B		B			VAL	(H)	B
	ILE	B		B			VAL	(H)	B

	PRO					PRO	(H)	B		B
	PRO	(H)				ALA	(H)	B		B
110	ILE	(H)	B		B	ILE	(H)	B		B
	GLN	(H)	B		B					
	GLU	(H)	B		B	110	GLU	(H)	B	B
	VAL	(H)	B		B		ILE	(H)	B	B
	PHE	(H)	B		B		PHE	(H)	B	B
	PRO			T	T		PRO		T	T
	ASP			T	T		ASP		T	T
	ARG						ARG			
	PHE	(H)			(H)		PHE			
	VAL	(H)			(H)		VAL			
120	PRO	(H)			(H)		PRO			
	ALA	(H)			(H)		THR			
	GLU	(H)			(H)	120	GLU			
	THR	(H)			(H)		THR			
	ILE	(H)			(H)		ILE			
	ASN	(H)			(H)		ASN			
	ARG	(H)			(H)		LEU	H		H
	ALA	(H)			(H)		ALA	H		H
	LEU	(H)			(H)		VAL	H		H
	LYS	(H)			(H)		LYS	H		H
130	VAL	(H)			(H)		GLU	H		H
	ASP	(H)			(H)		ALA	H		H
	LYS	(H)			(H)	130	ALA	H		H
	ILE	(H)			(H)		ASN			
	SER	(H)			(H)		HIS			
	ASP	(H)			(H)					
	PRO			T	T		PRO		T	T
	ASN			T	T		ASP	(H)	T	T
	LYS			T	T		GLN	(H)	(T)	(T)
	ASP			T	T		ASP	(H)	(T)	(T)
140	THR		B		B		ILE	(H)	B	B
	VAL		B		B		SER	(H)	B	B
							VAL	(H)	B	B
						140	HIS	(H)	B	B
							VAL	(H)	B	B
							VAL	(H)	B	B
	VAL		B		B					
	PRO		B		B		GLU	(H)	B	
	ILE		B		B					
	GLN		B		B		THR	(H)	B	(T)
	LYS		B	(T)	B		GLY		B	(T)
	THR		B	(T)	B		ASN		B	(T)
	GLY		B	(T)	B		ILE	H	B	H
	ASN		B	(T)	B		LEU	H	B	H
150	ILE		B		B		ASP	H		H
	ARG		B		B		GLU	H		H
	ASP					150	GLU	H		H
	PRO			T	T		TYR	H		H
	GLU			T	T		LYS	H		H
	TYR		B		B		LEU	H		H
	ASN		B		B		ALA	H		H
	VAL	(H)	B		B		TYR	H		H
	ALA	(H)	B		B		PHE	H		H
	TYR	(H)	B		B					
160	PHE	(H)	B		B					

	ARG	(H)	B		B		LYS	H		H
	GLU	(H)					GLU	H		H
	ASP	(H)					160 ASP	H		H
	ILE	(H)					VAL	H	(T)	(T)
	GLY						GLY	(H)	(T)	(T)
	ILE						THR	(H)	(T)	(T)
	ASN						ASN		(T)	(T)
	SER		(T)		(T)		ALA	(H)		(H)
	HIS	(H)	(T)		(T)		HIS	(H)		(H)
170	HIS	(H)	(T)		(T)		HIS	(H)		(H)
	TRP	(H)	B		B		TRP	(H)		(H)
	HIS	(H)	B		B		HIS	(H)		(H)
	TRP	(H)	B		B	170	TRP	(H)		(H)
	HIS	(H)	B		B		HIS	(H)		(H)
	LEU	(H)	B		B		ILE	(H)	B	B
	VAL	(H)	B		B		VAL	(H)	B	B
	TYR		B		B		TYR		B	B
	PRO	(H)	B		(H)		PRO		B	B
	ALA	(H)	B		(H)		ALA	B	(T)	B
							THR	B	(T)	B
180	PHE	(H)	B		(H)		TRP	(H)	B	B
	TYR	(H)	B		(H)					
	ASP	(H)			(H)		ASP	(H)		
	ALA	(H)			(H)	180	PRO	(H)	(T)	(T)
	ASP	(H)			(H)		ALA	(H)	(T)	(T)
	PHE	(H)			(H)		PHE	(H)		(H)
	PHE	(H)			(H)		MET	(H)		(H)
	GLY						GLY	(H)		(H)
	LYS	(H)			(H)		ARG	(H)		(H)
	ILE	(H)			(H)		MET	(H)		(H)
190	LYS	(H)			(H)		LYS	(H)		(H)
	ASP	(H)			(H)		ASP	(H)		(H)
	ARG	(H)	T		(H)		ARG	(H)	T	(H)
	LYS	(H)	T		(H)	190	LYS	(H)	T	(H)
	GLY	(H)	(T)				GLY	(H)	(T)	
	GLU	(H)					GLU	(H)		
	LEU	(H)	B		B		LEU	(H)	B	B
	PHE	(H)	B		B		PHE	(H)	B	B
	TYR		B		B		TYR		B	B
	TYR		B		B		TYR		B	B
200	MET	H	B		B		MET	H	B	B
	HIS	H	B		B		HIS	H	B	B
	GLN	H	B		B		GLN	H	B	B
	GLN	H	B		B	200	GLN	H	B	B
	MET	H	B		B		MET	H	B	B
	CYS	H	B		B		CYS	H	B	B
	ALA	H	B		B		ALA	H	B	B
	ARG	H					ARG	H		
	TYR				(T)		TYR		(T)	(T)
	ASP	(H)			(T)		ASP		(T)	(T)
210	CYS	(H)			(H)		CYS			
	GLU	(H)			(H)		GLU			
	ARG	(H)			(H)		ARG			
	LEU	(H)			(H)	210	LEU			
	SER	(H)			(H)		SER		T	T
	VAL	(H)			(H)		ASN		T	T

	GLY	(H)		(H)		GLY	(H)	(T)	(H)
	LEU	(H)		(H)		MET	(H)		(H)
	GLN	(H)		(H)		HIS	(H)		(H)
	ARG	(H)		(H)		ARG	(H)		(H)
220	MET	(H)		(H)		MET	(H)		(H)
	LEU	(H)		(H)		ILE	(H)		(H)
	PRO					PRO			
	PHE					220 PHE			
	GLN					SER			
	ASN					ASN			
	ILE	H	(T)	H		PHE	H	(T)	H
	ASP	H	(T)	H		ASP	H	(T)	H
	ASP	H		H		GLU	H		H
	GLU	H		H		LYS	H		H
230	LEU	H		H		LEU	H		H
	GLU	H	(T)	H		GLU	H	(T)	H
	GLY		(T)			GLY		(T)	
	TYR					230 TYR			
	SER					SER			
	PRO		T	T		ALA		(B)	(B)
	HIS		T	T		HIS		(B)	(B)
	LEU					LEU		(B)	(B)
	SER					THR		(B)	(B)
	SER					SER		(B)	(B)
240	LEU					LEU		(B)	(B)
	VAL					VAL		(B)	(B)
	SER					SER			
	GLY					240 GLY			
	LEU					LEU			
	SER		(T)	(T)		PRO			
	TYR		T	T		TYR			
	GLY		T	T		ALA			
	SER		(T)	(T)		PHE			
	ARG		(T)	(T)		ARG			
250	PRO		(T)	(T)		PRO		T	T
	ALA		(T)	(T)		ASP		T	T
	GLY		(T)	(T)		GLY		(T)	(T)
						250 LEU	(H)		H
						CYS	(H)		H
						LEU	(H)		H
	MET	(H)		(H)		MET	(H)		H
	HIS	(H)		(H)		ASP	(H)		H
	LEU	(H)		(H)		LEU	(H)		H
	ARG	(H)		(H)		LYS	(H)		H
	ASP	(H)		(H)		ASP	(H)		H
	ILE	(H)	(T)	(H)		ILE	(H)		H
	ASN		(T)	(T)					
260	ASP	(H)	T	(T)		ASP	(H)		H
	CYS	(H)	B	B		260 LEU	(H)		H
	SER	(H)	B	B					
	VAL	(H)	B	B					
	GLN	(H)	B	B		LYS	(H)		H
	MET	(H)	B	B		GLU	(H)		H
	GLU	(H)		(H)		MET	(H)		H
	ARG	(H)		(H)		PHE	(H)		H
						ARG	(H)		H

	TRP	(H)		(H)
	ARG	(H)		(H)
270	GLU	(H)		(H)
	ARG	(H)		(H)
	ILE	(H)		(H)
	LEU	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
	ALA	(H)		(H)
	ILE	(H)		(H)
	HIS	(H)		(H)
	THR	(H)		(H)
	GLY			
280	LEU			
	VAL			
	THR	(T)		(T)
	ASP	(T)		(T)
	SER	T		T
	HIS	T		T
	GLY	(T)		(T)
	LYS	H		H
	GLU	H		H
	ILE	H		H
290	LYS	H		H
	LEU	H		H
	THR	H		H
	GLU	H		H
	GLU	H	(T)	H
	ASN		(T)	
	GLY	B		B
	ILE	B		B
	ASN	B		B
	VAL	(H) B		B
300	LEU	(H) B		B
	GLY	(H) B		B
	ALA	(H) B		B
	LEU	(H) B		B
	ILE	(H) B		B
	GLU	(H)		
	SER	(H)		
	SER	(H)	(T)	(T)
	HIS	(H)	(T)	(T)
	ASP	(H)	(T)	(T)
310	SER		(T)	(T)
	VAL		(T)	(T)
	ASN		(T)	(T)
	LYS		(T)	(T)
	PRO		T	
	TYR	B	T	B
	TYR	B	(T)	B
	GLY	B		B
	THR	B		B
	LEU	B		B
320	HIS	B		B
	ASN	B	(T)	(T)
	TRP	B	(T)	(T)
	GLY			

	TRP	(H)		H
	ARG	(H)		H
	GLU	(H)		H
	ARG	(H)		H
270	ILE	(H)		H
	LEU	(H)		H
	ASP	(H)		H
	ALA	(H)		H
	ILE	(H)		H
	ASP	(H)	(T)	(T)
	SER	(H)	T	T
	GLY		T	T
	TYR	B	(T)	B
	TYR	B		B
280	ILE	B		B
	ASP	B		B
	ASN	B		B
	GLU		(T)	(T)
	GLY		(T)	(T)
	HIS	(H) B		B
	GLN	(H) B		B
	VAL	(H) B		B
	LYS	(H) B		B
	LEU	(H) B		B
290	ASP	(H) B		B
	ILE	(H) B		B
	VAL	(H) B		B
	ASP	(H)		
	GLY			
	ILE	B		B
	ASN	B		B
	VAL	(H) B		B
	LEU	(H) B		B
	GLY	(H) B		B
300	ALA	(H) B		B
	LEU	(H) B		B
	ILE	(H) B		B
	GLU	(H)		
	SER	(H)		
	SER	(H)	(T)	(T)
	HIS	(H)	(T)	(T)
	GLU	(H)		(H)
	THR	(H)		(H)
	LYS	(H)	T	(H)
310	ASN	(H)	T	(H)
	LYS	(H)		(H)
	LEU	(H)		(H)
	TYR			
	TYR		(T)	(T)
	GLY		(T)	(T)
	SER			
	LEU			
	HIS			
	ASN		(T)	(T)
320	TRP		(T)	(T)
	GLY			

	HIS	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	MET	(H)		(H)
	ILE	(H)		(H)
	ALA	(H)		(H)
	ARG	(H)		(H)
330	ILE	(H)		(H)
	HIS	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
	ALA	(H)	T	(H)
	ASP	(H)	T	(H)
	GLY		T	T
	ARG		T	T
	TYR		(T)	(T)
	ARG			
	THR		(T)	(T)
340	ASN		(T)	(T)
	PRO		T	T
	GLY		T	T
	VAL			
	MET			
	ASP		(T)	(T)
	ASP		(T)	(T)
	THR		T	T
	SER		T	T
	THR		(T)	(T)
350	SER		(T)	(T)
	LEU			
	ARG		(T)	(T)
	ASP		(T)	(T)
	PRO			
	ILE		B	B
	PHE		B	B
	TYR		B	B
	ARG		B	B
	TYR		B	B
360	HIS	(H)	B	B
	ARG	(H)	B	B
	TRP	(H)	B	B
	MET	(H)	B	B
	ASP	(H)	B	B
	ASN	(H)	B	B
	ILE	(H)	B	B
	PHE	(H)	B	B
	GLN	(H)		
	GLU	(H)		
370	TYR	(H)		
	LYS	(H)		
	HIS	(H)		
	ARG	(H)		
	LEU	(H)		
	PRO		T	T
	SER		T	T
	TYR		(T)	(T)
	THR	(H)		(H)

	HIS	H		H
	VAL	H		H
	MET	H		H
	LYS	H		H
	MET	H		H
	ALA	H		H
	ARG	H		H
	LEU	H		H
330	GLN	H		H
	ASP	H		H
	PRO		T	T
	ASP		T	T
	HIS		(T)	(T)
	ARG			
	PHE			
	ASN			
	GLU		(T)	(T)
	ASN		(T)	(T)
340	PRO		T	T
	GLY		T	T
	VAL			
	MET			
	SER		(T)	(T)
	ASP		(T)	(T)
	THR		T	T
	SER		T	T
	THR		(T)	(T)
	SER		(T)	(T)
350	LEU			
	ARG		(T)	(T)
	ASP		(T)	(T)
	PRO			
	ILE		B	B
	PHE		B	B
	TYR		B	B
	ARG		B	B
	TYR		B	B
	HIS		B	B
360	ARG		B	B
	PHE		B	B
	ILE		B	B
	ASP		B	B
	ASN		B	B
	ILE	(H)	B	(H)
	PHE	(H)	B	(H)
	GLN	(H)	B	(H)
	LYS	(H)	B	(H)
	TYR	(H)	B	(H)
370	ILE	(H)	B	(H)
	ALA	(H)	B	(H)
	THR	(H)	B	(H)
	LEU	(H)	B	(H)
	PRO		B	T
	HIS		B	T
	TYR		B	
	THR		B	

	HIS	(H)		(H)		PRO		T		T
380	GLN	(H)		(H)		GLU		T		T
	GLN	(H)		(H)		380 ASP		(T)		(T)
	LEU	(H)		(H)		LEU	B			
	ASP	(H)		(H)		THR	B			
	PHE	(H)		(H)		CYS	B			
	PRO					PRO	B	T		T
	GLY					GLY	B	T		T
	VAL	B		B		VAL	B			B
	ARG	B		B		HIS	B			B
	ILE	B		B		VAL	B			B
390	SER	B		B		VAL	B			B
	ARG	B		B		390 ASN	B			B
	VAL	B		B		VAL	(H) B			(H)
	THR	B		B		THR	(H) B			(H)
	VAL	B		B		VAL	(H) B			(H)
	ARG					ASN	(H) B			(H)
	SER					ALA	(H) B			(H)
	LYS					LYS	(H)			(H)
	VAL					VAL	(H)			(H)
400	PRO					PRO				
	ASN	B		B		ASN				
	ILE	B		B		400 VAL	H			H
	LEU	B		B		VAL	H			H
	HIS	B		B		THR	H			H
	THR	B	T	B		THR	H			H
	TYR	B	T	B		PHE	H			H
	SER	(H)				MET	H			H
	LYS	(H)	T	T		LYS	H			H
	ASP	(H)	T	T		GLU	H			H
	SER	(H)		(H)		ALA	H			H
410	LEU	(H)		(H)		GLU	H			H
	LEU	(H)		(H)		410 LEU	H			H
	GLU	(H)		(H)		GLU	H			H
	LEU	(H)		(H)		LEU	H			H
	SER	(H)	(T)	(H)		SER	H	(T)		(T)
	HIS	(H)	(T)	(H)		TYR		(T)		(T)
	GLY		(T)			GLY		(T)		(T)
	LEU			B		ILE				
	ASN			B		ASP				
	ILE			B		PHE		(T)		(T)
420	LYS			B		GLY		(T)		(T)
	GLY			B		420 SER		(T)		(T)
	HIS	(H) B		B		ASP	(H)	(T)		(T)
	ILE	(H) B		B		HIS	(H)	(T)		(T)
	GLN	(H) B		B		SER	(H)			
	VAL	(H) B		B		VAL	(H) B			B
	LYS	(H) B				LYS	(H) B			B
	TYR	(H) B	(T)	(T)		VAL	(H) B			B
	ASN	(H) B	(T)	(T)		LEU	(H) B			B
	TYR	(H) B				TYR		B		B
430	GLU	H		H		ARG		B		B
	HIS	H		H		430 HIS		B		B
	LEU	H		H		LEU		B		B
	ASP	H		H		ASP				
	HIS	H		H		HIS				

	GLU	H		H
	PRO		T	T
	TYR		T	T
	ASN		T	T
	TYR	(H)		(H)
440	GLU	(H)		(H)
	ILE	(H)		(H)
	GLU	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	ASP	(H)	(T)	(H)
	ASN		(T)	(T)
	ARG		T	T
	THR		T	T
	GLY		(T)	(T)
	GLU	H		H
450	ALA	H		H
	ARG	H		H
	GLU	H		H
	THR	H		H
	CYS	H	B	H
	VAL	H	B	H
	ARG	H	B	H
	ILE	H	B	H
	PHE	H	B	H
	LEU	H	B	H
460	ALA	H	B	H
	PRO		T	T
	LYS		T	T
	TYR		(T)	(T)
	ASP			
	GLU			
	LEU			
	GLY		(T)	(T)
	ASN		(T)	(T)
	ARG	H		H
470	LEU	H		H
	LEU	H		H
	LEU	H		H
	GLU	H		H
	GLU	H		H
	GLN	H		H
	ARG	H		H
	ARG	H		H
	LEU	H		H
	TYR			
480	ILE	H		H
	GLU	H		H
	LEU	H		H
	ASP	H		H
	LYS	H		H
	PHE	H		H
	HIS	H		H
	ARG	H		H
	ARG	H		H
	LEU	H		H
490	GLU	H		H

	GLU			
	PRO			
	PHE	B		B
	THR	B		B
	TYR	B		B
	ASN	B		B
440	ILE	B		B
	SER			
	VAL			
	GLU		(T)	(T)
	ASN		(T)	(T)
	SER		T	T
	SER		T	T
	GLY		T	T
	GLY		(T)	(T)
	ALA	(H)		
450	LYS	(H)		
	ASP	(H)		
	VAL	(H)	B	B
	THR	(H)	B	B
	MET	(H)	B	B
	ARG	(H)	B	B
	ILE	(H)	B	B
	PHE	(H)	B	B
	LEU	(H)	B	B
	GLY			
460	PRO		T	T
	LYS		T	T
	TYR		(T)	(T)
	ASP			
	GLU			
	LEU			
	GLY		(T)	(T)
	ASN		(T)	(T)
	ARG			
	LEU	(H)		
470	GLN	(H)		
	PRO	(H)		
	GLU	(H)		
	GLN	(H)	B	B
	GLN	(H)	B	B
	ARG	(H)	B	B
	THR	(H)	B	B
	LEU	(H)	B	B
	ASN	(H)	B	B
	ILE	H	B	B
480	GLU	H		H
	LEU	H		H
	ASP	H		H
	LYS	H		H
	PHE	H		H
	LYS	H		H
	ALA	H		H
	THR	H		H
	LEU	H		H
	ASP	H		H

	PRO		T	T
	GLY		T	T
	LYS		(T)	(T)
	ASN	B	(T)	(T)
	VAL	(H) B		B
	LEU	(H) B		B
	VAL	(H) B		B
	ARG	(H) B		B
	ALA	(H) B	(T)	B
500	SER	(H)	(T)	(T)
	GLY		T	T
	ASP		T	T
	SER		(T)	(T)
	SER		(T)	(T)
	VAL			
	THR			
	LEU			
	SER			
	LYS	(H)		H
510	VAL	(H)		H
	PRO	(H)		H
	THR	(H)		H
	PHE	(H)		H
	GLU	(H)		H
	GLU	(H)		H
	LEU	(H)		H
	GLU	(H)		H
	SER	(H)	(T)	(T)
	GLY		(T)	(T)
520	ASN		(T)	(T)
	ALA			
	ASN			
	VAL		(T)	(T)
	ASN		(T)	(T)
	PRO		T	T
	ASN		T	T
	GLU		(T)	(T)
	TYR		(T)	(T)
	CYS			
530	SER		T	T
	ASP		T	T
	GLY		T	T
	LYS	(H)		(H)
	PRO	(H)		(H)
	GLU	(H)		(H)
	HIS	(H) (B)		(H)
	MET	(H) (B)		(H)
	LEU	(H) (B)		(H)
	VAL	(H) (B)		(H)
540	PRO	(B)	T	T
	ARG		T	T
	GLY		T	T
	LYS	(H)	(T)	(T)
	GLU	(H)	(T)	(T)
	ARG	(H)		
	GLY	H		

490	PRO		T	T
	GLY		T	T
	LYS		(T)	
	ASN	B	(T)	B
	VAL	B		B
	VAL	B		B
	THR	B		B
	ARG	B	(T)	B
	ASP		(T)	
	HIS			
500	ARG		T	T
	ASN		T	T
	SER	B		B
	THR	(H) B		B
	VAL	(H) B		B
	THR	(H) B		B
	VAL	(H) B		B
	GLU	(H)		
	GLN	(H)		
	SER	(H)		(H)
510	VAL	(H)		(H)
	PRO	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	LYS	(H)		(H)
	LYS	(H)		(H)
	LEU	(H)		(H)
	ARG	(H)		(H)
	GLU	(H)		(H)
	GLU	(H)	(T)	(H)
	GLY		(T)	
520	GLY			
	VAL			
	ALA			
	GLY			
	GLU		(T)	(T)
	TYR		(T)	(T)
	CYS			
	SER		T	T
	ASP		T	T
	GLY		T	T
530	LYS	(H)		(H)
	PRO	(H)		(H)
	GLU	(H)		(H)
	HIS	(H) (B)		(H)
	MET	(H) (B)		(H)
	LEU	(H) (B)		(H)
	ILE	(H) (B)		(H)
	PRO	(B)	(T)	(T)
	LYS		T	T
	GLY		T	T
540	ASN			
	HIS		(T)	(T)
	ARG		T	T
	GLY		T	T

	MET	(H)	(T)	(T)
	ASP	(H)	(T)	(T)
	PHE	(H)	B	B
550	TYR	(H)	B	B
	LEU	(H)	B	B
	PHE	(H)	B	B
	VAL	(H)	B	B
	MET	(H)	B	B
	LEU	(H)	B	B
	THR	(H)	B	B
	ASP	(H)	B	
	TYR	(H)	B	
	GLU	(H)		(H)
560	GLU	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
	SER	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	GLN	(H)		(H)
	GLY	(H)		(H)
	ALA	(H)	(T)	(H)
	GLY	(H)	(T)	(H)
	GLU	(H)		(H)
	GLN	(H)		(H)
570	THR	(H)		(H)
	ILE	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
	GLN	(H)	(T)	(T)
	ASP	(H)	(T)	(T)
	ALA	(H)	B	B
	VAL	(H)	B	B
	SER	(H)	B	B
	TYR		B	B
	CYS		B	B
580	GLY	(H)		(H)
	ALA	(H)		(H)
	LYS	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
	GLN	(H)	(T)	(H)
	LYS	(H)	(T)	(H)
	TYR			
	PRO	(H)	T	(H)
	ASP	(H)	T	(H)
590	LYS	(H)	(T)	(H)
	LYS	(H)		(H)
	ALA	(H)		(H)
	MET	(H)		(H)
	GLY			
	TYR			
	PRO		(T)	(T)
	PHE		(T)	(T)
	ASP			
	ARG			
	PRO			
600	ILE		B	B
	GLN		B	B
	VAL		B	B

	MET	(H)	(T)	(T)
	ASP	(H)	(T)	(T)
	PHE	(H)		
	GLU	(H)		
	LEU	(H)	B	B
	PHE	(H)	B	B
550	VAL	(H)	B	B
	ILE	(H)	B	B
	VAL	(H)	B	B
	THR	(H)	B	B
	ASP	(H)		
	TYR			
	ALA	(H)		(H)
	GLN	(H)		H
	ASP	(H)		H
	ALA	(H)		H
560	VAL	(H)	(T)	H
	ASP	(H)	(T)	H
	GLY	(H)	(T)	(T)
	GLU	(H)	(T)	(T)
	ASN	(H)		
	ALA	(H)		(H)
	GLU	(H)		(H)
	CYS	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
570	ALA	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	SER	(H)		(H)
	TYR		(T)	(T)
	CYS		(T)	(T)
	GLY			
	ALA	(H)		(H)
	LYS	(H)		(H)
	ASP	(H)		(H)
	GLN	(H)	(T)	(H)
580	LYS	(H)	(T)	(H)
	TYR	(H)		(H)
	PRO		T	T
	ASP		T	T
	LYS		(T)	(T)
	LYS		(T)	(T)
	PRO			
	MET		(T)	(T)
	GLY		(T)	(T)
	PHE	(H)		(H)
590	PRO	(H)	(T)	(H)
	PHE	(H)	(T)	(H)
	ASP	(H)		(H)
	ARG	(H)		(H)
	VAL	(H)		(H)
	ILE	(H)		(H)
	GLU	(H)		(H)
	GLY	(H)		(H)

ARG	B		B	LEU	(H)		(H)
THR	B		B	THR	(H)		(H)
PRO	(B)	T	T	600 PHE	(H)		(H)
SER	(B)	T	T	GLU	(H)		(H)
GLN	(B)			GLU	(H)		(H)
PHE	(B)			PHE	(H)		(H)
LYS	(B)			LEU	(H)		(H)
610 THR	(B)			THR	(H)		(H)
PRO		T	T	VAL	(H)		(H)
ASN	B	T	T	SER	(H)		(H)
MET	H B		H	MET		T	T
ALA	H B		H	SER	(H)	T	T
PHE	H B		H	610 CYS	(H)		
GLN	H B		H	THR	(H)		
GLU	H B		H	ASP	(H)		
ILE	H B		H	VAL	(H)	B	B
ILE	H B		H	ARG	(H)	B	B
620 ILE	H B		H	ILE	(H)	B	B
GLN	H B		H	LYS	(H)	B	B
TYR	B			TYR		B	B
GLU				THR			
GLY				ASP			
HIS				620 ILE			
LYS				LYS			
627 HIS							

Abb. 31:

Sekundärstruktur-Vorhersagen für die Untereinheiten d und e von Eurypelma californicum-Hämocyanin.

Die Spalten 1 und 4 zeigen die Aminosäure-Sequenzen der beiden Untereinheiten. Zur Zuordnung homologer Abschnitte wurden Lücken eingefügt. Die Spalten 2 und 5 zeigen die vorläufigen Vorhersagen mit Überlappungen von Strukturbereichen, die Spalten 3 und 6 die endgültigen Vorhersagen. Symbole in Klammern bedeuten, daß der Abschnitt die Vorhersageregeln und Bedingungen nur mit einer relativ niedrigen Wahrscheinlichkeit erfüllt.

H = α -Helix, B = β -faltblatt, T = Reverse Turn, Abschnitte ohne Symbol entsprechen der Coil-Struktur.

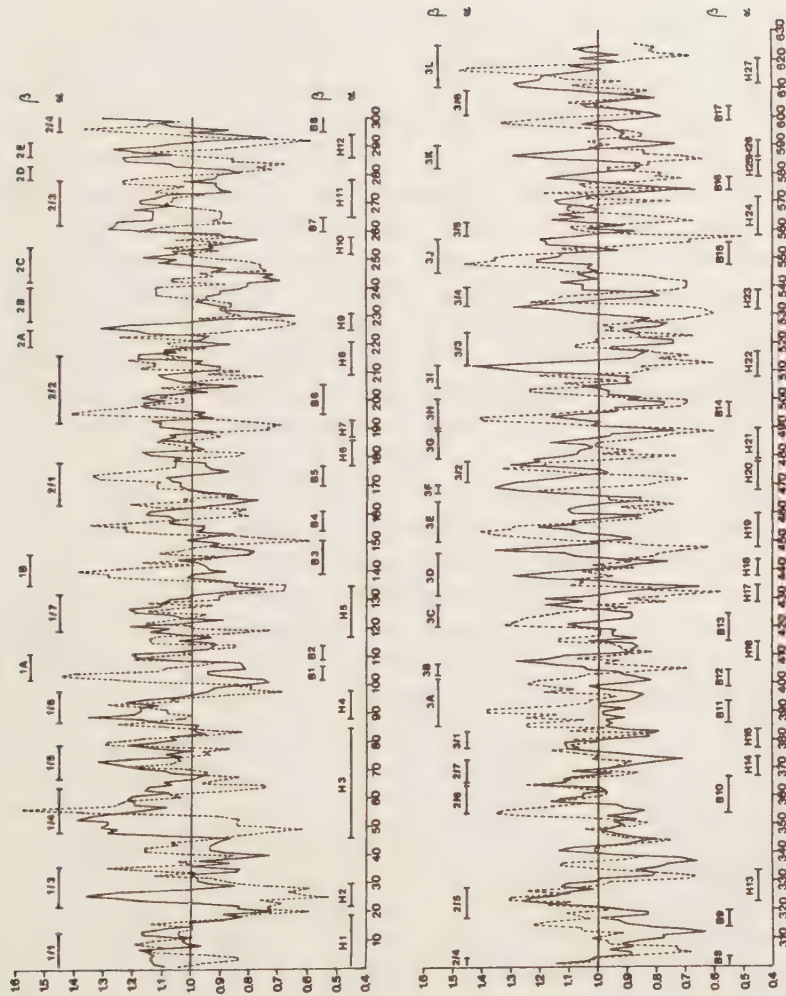
Abb. 32:

Konformationsprofil der Unterinheit d (Darstellung nach FASMAN et al., 1976).

(—): α -Helix-Potential $\langle P_{\alpha} \rangle$ der Tetrapeptide i bis i + 3. (---): β -Faltblatt-Potential $\langle P_{\beta} \rangle$ der Tetrapeptide i bis i + 3. Abschnitte mit Potential zur α -Helix- oder β -Faltblatt-Ausbildung liegen über 1,0, solche mit Tetrapeptid-Brechern unter 1,0.

Unterhalb des Konformationsprofils sind die vorhergesagten α -Helix-(HX) und β -Faltblatt-Bereiche (BX) eingezeichnet, wobei die Nummerierung fortlaufend erfolgt.

Oberhalb des Konformationsprofils sind die α -Helix- und β -Faltblatt-Bereiche dargestellt wie sie sich aus der Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus interruptus-HC nach Zuordnung homologer Sequenzabschnitte ergeben. Nach GAYKEMA et al. (1984) wurden die Helices der 3 Domänen mit jeweils 2 Ziffern (1/1 bis 3/6) bezeichnet, die β -Stränge mit einer Ziffer und einem Großbuchstaben (1A bis 3L).



2. Circular dichroismus-Spektroskopie

a) CD-Spektren des nativen Hämocyans

Die Messung des Circular dichroismus an Proteinen stellt eine Methode dar, die Aussagen sowohl über die Sekundärstruktur und deren Änderung, als auch über räumliche Änderungen von kleinen Bereichen im Molekül (Seitenketten-Effekte) zuläßt. Solche Änderungen können hervorgerufen werden z.B. durch Anlagerung von Liganden, Substratmolekülen bei Enzymen oder durch Sauerstoffbindung bei Atmungspigmenten. Die sehr aufwendige Röntgenstruktur-Analyse, die neben Aussagen zur Tertiärstruktur eines Moleküls auch solche zur Sekundärstruktur miteinschließt, erlaubt meistens nicht, vergleichende Untersuchungen durchzuführen, zumal nicht immer die Kristallisation eines Proteins gelingt, die Voraussetzung für eine derartige Analyse ist. Um Unterschiede in der Struktur zwischen einem mit Sauerstoff beladenen Molekül (oxygeniert) und einem Sauerstoff-freien (desoxygeniert) festzustellen, müßte sowohl ein Kristall des oxygenierten als auch des desoxygenierten Moleküls gezüchtet und der entsprechende Zustand aufrecht erhalten werden, was mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist. Die CD-Spektroskopie dagegen ermöglicht die Messung am gelösten Protein.

Messungen des Circular dichroismus an Hämocyaminen wurden bisher meistens am Gesamtmolekül durchgeführt oder am Dissoziationsgemisch, nicht jedoch an isolierten Untereinheiten. Eine knappe Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse an Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaminen geben ELLERTON et al. (1983).

Zunächst wurde natives Hämocyanin (37 S) CD-spektroskopisch untersucht, um Gemeinsamkeiten und evt. Unterschiede zu anderen Hämocyaminen, speziell Arthropoden-Hämocyaminen, festzustellen. Dazu wurden die Spektren im Wellenlängenbereich von 200 - 260 nm aufgezeichnet. Das Spektrum des oxygenierten Hämocyans (Abb. 33) zeigt einen Verlauf der sog. Peptidbande, wie er für Proteine mit relativ niedrigem α -Helix-Gehalt charakteristisch ist. Bei 222 nm ist nämlich nur andeutungsweise ein schwach negativer Gipfel, der als Indikator für den α -Helix-Gehalt gelten kann, erkennbar. Berechnet man den α -Helix-Gehalt nach den empirischen Formeln von CHEN und YANG (1971), so ergibt sich ein Wert von ca. 10 % (Tab. 14).

Zur Messung der Peptidbande des Desoxy-Hämocyanins wurde dieses durch 3stündiges Überleiten von Argon in einer gasdichten Kammer desoxygeniert. Desoxygenierung mit NaHSO_3 kam nicht in Betracht, da NaHSO_3 in diesem Bereich stark absorbiert. Das Spektrum zeigt im Verlauf keine wesentliche Änderung im Vergleich zum Oxy-Hämocyanin (Abb. 33), allerdings eine geringe Abnahme des CD-Signals, die einer berechneten α -Helix-Verminderung von 2,1 % entspräche. Dieses Ergebnis war sowohl in mehreren Messungen an einer Probe, als auch mit verschiedenen Proben reproduzierbar. Eine Konzentrationsänderung während der Desoxygenierung kann weitgehend ausgeschlossen werden, da mit Wasserdampf gesättigtes Argon verwendet wurde. Eine Volumenverminderung und damit eine Konzentrationserhöhung der Probe hätte im übrigen eine Verstärkung des CD-Signals hervorrufen müssen.

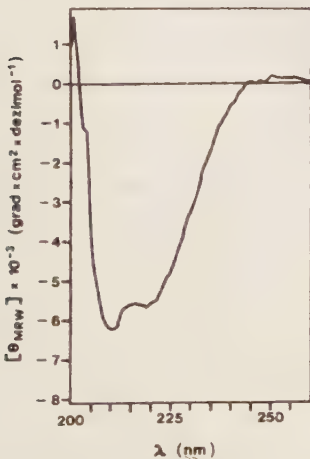


Abb. 33 a: 37 S-HC,ox

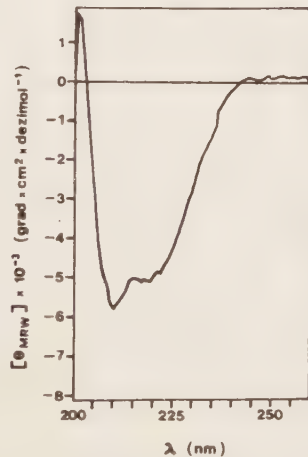


Abb. 33 b: 37 S-HC,desox

Abb. 33:

CD-Spektren (Peptidbande) von oxygeniertem (a) und desoxygeniertem (b) 37 S-Hämocyanin. Raumtemperatur; Oxygenierung mit Luft, Desoxygenierung mit Argon; Küvette: 0,1 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, Proteinkonzentration: 0,1 mg/ml.

Θ_{MRW} ist die auf eine mittlere Aminosäurerestmasse von 116 bezogene Elliptizität.

Über optisch aktive Aminosäure-Seitenketten und deren Positionsänderungen, sowie über Änderungen im Bereich des aktiven Zentrums gibt der Spektralbereich von 250 - 730 nm Aufschluß. Das Spektrum des

oxygenierten Hämocyanins (Abb. 34) erweist sich als typisches Arthropoden-Hämocyanin-Spektrum mit zwei deutlichen negativen Banden mit Maxima bei 283 nm und 340 nm und zwei schwach positiven Banden bei 505 nm und 622 nm. Die Bestimmung der Maxima der schwach positiven Banden war möglich durch Aufnahme des Spektrums im Bereich von 450 - 800 nm bei größerer Empfindlichkeit (Abb. 35).

Abb. 34 a: 37 S-HC,ox

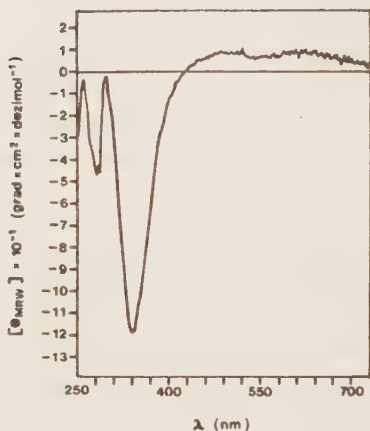


Abb. 34 b: 37 S-HC,desox

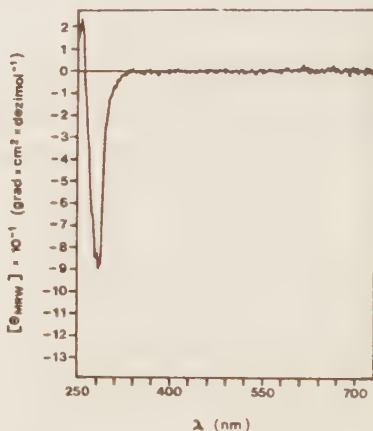


Abb. 34:

CD-Spektren (naher UV-Bereich und sichtbarer Bereich) von oxygeniertem (a) und desoxygeniertem (b) 37 S-Hämocyanin. Raumtemperatur; Oxygenierung mit Luft, Desoxygenierung mit 0,059 M NaHSO₃ im Puffer; Küvette: 1 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, Proteinkonzentration: 1 mg/ml.

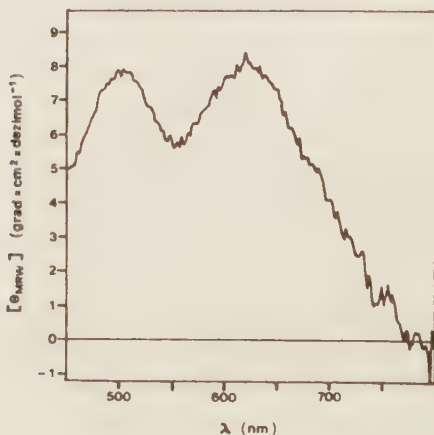


Abb. 35:

CD-Spektrum von oxygeniertem 37 S-Hämocyanin (450 - 800 nm). Raumtemperatur; Oxygenierung mit Luft; Küvette: 1 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, Proteinkonzentration: 1 mg/ml.

Zur raschen und vollständigen Desoxygenierung des Hämocyanins konnte in diesen Versuchen die Lösung mit NaHSO_3 versetzt werden (TAKESADA und HAMAGUCHI, 1968). Vollständige Desoxygenierung war im Absorptionsspektrum am Verschwinden der 340 nm-Bande erkennbar, was sowohl beim intakten Hämocyanin als auch bei den Untereinheiten in der Regel nach 30 Minuten erreicht war. Im CD-Spektrum des desoxygenierten Hämocyanins (Abb. 34) sind die negative 340 nm-Bande und die positiven Banden bei 505 nm und 622 nm, wie auch bei den übrigen CD-spektroskopisch untersuchten Hämocyaninen, völlig verschwunden. Die 283 nm-Bande ist dagegen beim desoxygenierten Vogelspinnen-Hämocyanin, wie auch bei anderen Arthropoden-Hämocyaninen, in ihrer Intensität etwa um das Doppelte verstärkt. Beim desoxygenierten Hämocyanin ist weiterhin eine positive Bande bei 257 nm erkennbar, die der bei anderen Hämocyaninen beschriebenen 251 nm-Bande entsprechen müßte.

Um zu überprüfen, ob das Molekül durch den Einfluß von NaHSO_3 geschädigt wird, wurde das desoxygenierte Hämocyanin 12 Stunden gegen denselben Tris/HCl-Puffer, aber frei von NaHSO_3 , dialysiert, um NaHSO_3 zu entfernen. Das aufgenommene Spektrum zeigte sämtliche Banden, die für oxygeniertes Hämocyanin charakteristisch sind. Damit ist auch beim Vogelspinnen-Hämocyanin gezeigt, wie schon früher beim Hämocyanin von Octopus vulgaris (TAKESADA und HAMAGUCHI, 1968), daß alle Änderungen am Molekül, die durch Zufügen von NaHSO_3 bewirkt werden, voll reversibel sind.

b) CD-Spektren der Hämocyanin-Untereinheiten

Die Möglichkeit, die das native Hämocyanin (37 S) aufbauenden Untereinheiten a, d, e, f und g als Monomere und b und c als Heterodimer bc relativ rein zu isolieren (SCHNEIDER et al., 1977), ermöglichte erstmals Hämocyanin-Untereinheiten CD-spektroskopisch zu untersuchen. Es sollte festgestellt werden, ob individuelle Unterschiede, wie sie sich zum Beispiel immunologisch (LAMY et al., 1979), im Molekulargewicht (SCHNEIDER et al., 1977) und in der Primärstruktur (bis jetzt bei UE d und e vollständig aufgeklärt) zeigen, auch in den CD-Spektren in Erscheinung treten würden. Dabei sollten sowohl die oxygenierten Untereinheiten als auch die desoxygenierten Untereinheiten untersucht,

und Unterschiede zwischen diesen in den Vergleich miteinbezogen werden. Bei der Untersuchung des nativen HC konnte für die Berechnung der Elliptizität aus dem Circular dichroismus davon ausgegangen werden, daß eine Extinktionseinheit (1 OD), gemessen bei 280 nm, einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml entsprechen würde (LOEWE und LINZEN, 1973). Dabei sind für die Absorption bei 280 nm vor allem die beiden aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin verantwortlich. Der Gehalt an diesen Aminosäuren unterscheidet sich jedoch in den verschiedenen Untereinheiten. Um die Elliptizitätswerte der Untereinheiten besser vergleichen zu können, wurden daher aufgrund der AS-Analysen (MARKL et al. 1979) Korrekturfaktoren berechnet, die den unterschiedlichen Gehalt an Tryptophan und Tyrosin bei den einzelnen Untereinheiten berücksichtigen (Tab. 12).

Untereinheit	Korrekturfaktor
<u>a</u>	0,58
<u>bc</u>	1,34
<u>d</u>	1,07
<u>e</u>	0,90
<u>f</u>	1,03
<u>g</u>	1,08

Tab. 12:

Korrekturfaktoren zur Bestimmung der Konzentration der isolierten Untereinheiten aus ihrer Extinktion bei 280 nm.

Die Korrekturfaktoren wurden unter der Voraussetzung berechnet, daß bei nativem HC eine Extinktionseinheit 1 µg Protein pro ml entspricht (LOEWE und LINZEN, 1973). Dabei wurde der zahlenmäßige Anteil der verschiedenen Untereinheiten am Aufbau des nativen Moleküls, der unterschiedliche Tryptophan- und Tyrosin-Gehalt der Untereinheiten (MARKL et al., 1979) und der relative Anteil von Tryptophan und Tyrosin an der Extinktion bei 280 nm berücksichtigt.

Zunächst sollen die Unterschiede, die sich in der Peptidbande (ca. 200–250 nm) ergeben, d.h. Unterschiede in der Sekundärstruktur dargestellt werden. Betrachtet man den Verlauf der Peptidbanden der oxygenierten Untereinheiten (Abb. 36), so läßt sich bei den Untereinheiten a, e, f und dem Heterodimer bc ein ähnlicher Verlauf erkennen. Das Maximum liegt bei ca. 210 nm, dann folgt bei a, e, f und bc zunächst ein Anstieg zu positiveren Werten, wobei dieser Anstieg bei dem Heterodimer bc am stärksten ausgeprägt ist. Bei 220 nm ist bei allen Untereinheiten kein deutlich ausgeprägtes Maximum erkennbar, das als Indikator für einen höheren α -Helix-Anteil angesehen werden könnte. Bei den Unterein-



Abb. 36 a

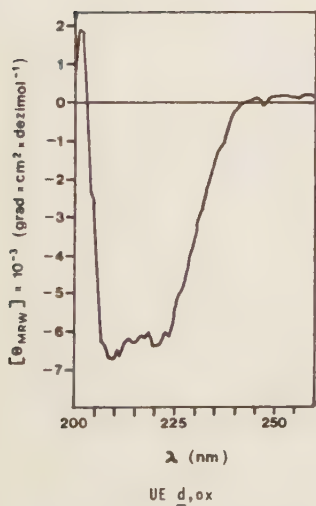
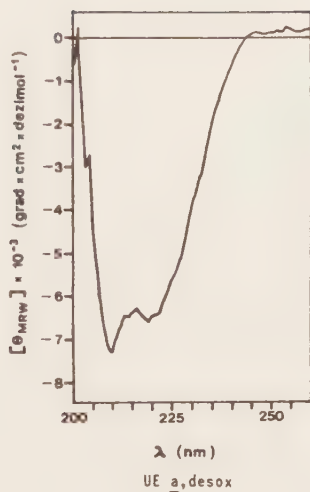
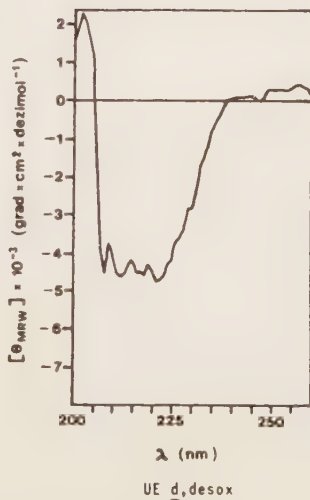


Abb. 36 b



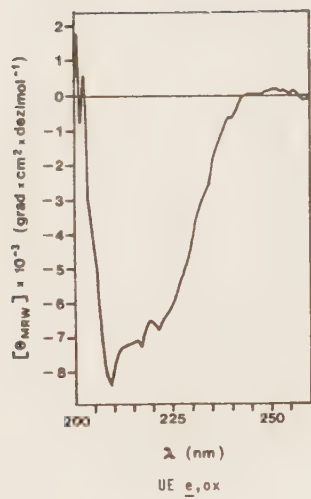


Abb. 36 c

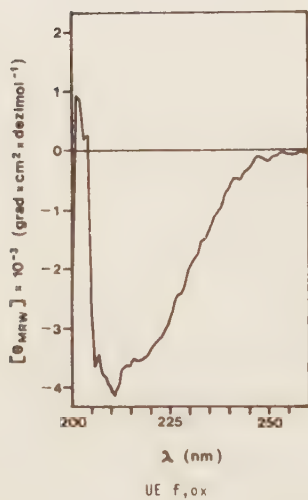
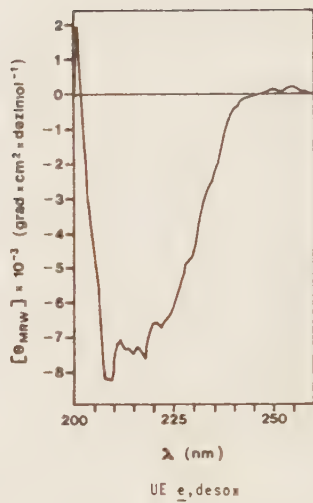
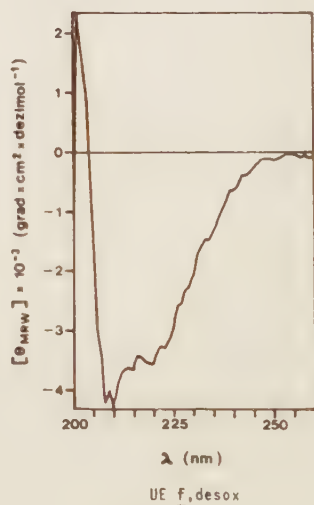
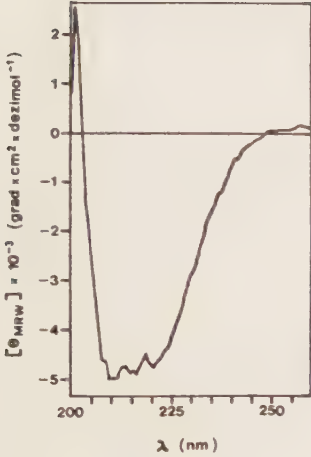
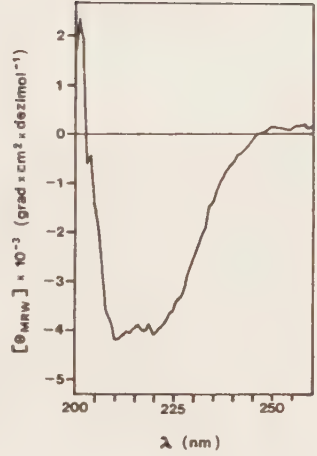


Abb. 36 d





UE g,ox



UE g,desox

Abb. 36 e

bc,ox

Abb. 36 f

bc,desox

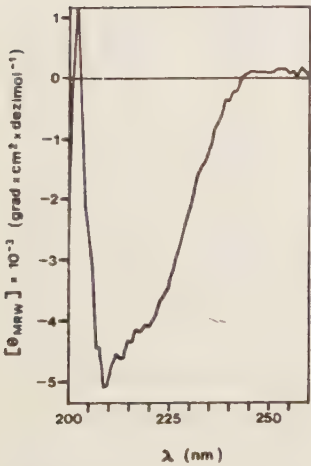


Abb. 36:

CD-Spektren (Peptidbande) der oxygenierten (links) und desoxygenierten (rechts) Untereinheiten.

a) UE a, b) UE d, c) UE e, d) UE f, e) UE g, f) Heterodimer bc.

Raumtemperatur; Oxygenierung mit Luft, Desoxygenierung mit Argon; Küvette: 0,1 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0; die Extinktion der Proteinlösungen wurde auf 0,1 eingestellt.

Θ_{MRW} ist die auf eine mittlere Aminosäurerestmasse von 116 bezogene Elliptizität.

heiten d und g dagegen fehlt ein ausgeprägtes Maximum auch bei 210 nm, zu höheren Wellenlängen hin erfolgt ein flacher Anstieg (Abb. 36).

Die Untereinheiten wurden wie beim intakten Gesamtmolekül durch Überleiten von Argon desoxygeniert. Bei den Spektren der desoxygenierten Untereinheiten (Abb. 36) fällt auf, daß bei der Untereinheit e praktisch keine Änderung in der Größe der CD-Bande auftritt, bei der Untereinheit a und dem Heterodimer bc eine relativ schwache Abnahme der Bande erfolgt, bei der Untereinheit f eine Intensitätszunahme und Änderung des Kurvenverlaufs und bei den Untereinheiten d und g dagegen eine starke Abnahme in der Intensität, wobei diese bei der Untereinheit d am stärksten ausgeprägt ist. Wurden die Untereinheiten d und g wieder mit Sauerstoff beladen, so zeigte sich wieder das für die oxygenierten Moleküle charakteristische CD-Signal. Es muß sich also bei diesen Untereinheiten um einen reversiblen Vorgang handeln, der eine relativ starke, im Detail unbekannte, Strukturänderung widerspiegelt. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden bei der Untereinheit d auch Spektren mit einer anderen Probe am oxygenierten und desoxygenierten Molekül aufgenommen, welche das gleiche Resultat erbrachten.

Elliptizitätswerte (θ_{MRW}) für oxygenierte und desoxygenierte Untereinheiten bei den Wellenlängen 220, 221 und 222 nm sind in Tabelle 13 angegeben. Es sind sowohl die Werte aufgeführt, die sich aus den jeweiligen Spektren direkt ergeben, als auch diejenigen, die man nach Multiplikation mit den entsprechenden Korrekturfaktoren erhält. Die daraus nach den empirischen Formeln von CHEN und YANG (1971) abgeleiteten α -Helix-Gehalte sind in Tabelle 14 aufgeführt. Für die Untereinheit f, deren Elliptizitätswerte ungewöhnlich niedrig sind (siehe Diskussion), wurden keine α -Helix-Gehalte angegeben. Entsprechend den korrigierten Werten müßte die oxygenierte Untereinheit a mit 4,1 % den geringsten α -Helix-Anteil besitzen, die Untereinheit d dagegen den höchsten. Berechnet man aus den korrigierten α -Helix-Werten der einzelnen oxygenierten Untereinheiten (mit Ausnahme von Untereinheit f) den α -Helix-Gehalt für das Gesamtmolekül unter Berücksichtigung der Anzahl der einzelnen Untereinheiten im Gesamtmolekül, so erhält man 8,7 % α -Helix-Gehalt. Dieser Wert stimmt relativ gut mit demjenigen, der für das Gesamtmolekül (8,9 %) erhalten wurde, überein. Auch der aus den Untereinheiten errechnete Wert für das desoxygenierte Molekül (6,4 %) ergibt eine gute Übereinstimmung mit dem direkt für das Gesamtmolekül bestimmten Wert. Dies könnte als Hinweis dafür gelten, daß

die bei den verschiedenen isolierten Untereinheiten erfolgenden Umlagerungen bei Desoxygenierung bzw. Oxygenierung auch im intakten, nativen Molekülverband auftreten.

Tab. 13:

Elliptizitäts-Werte (Θ_{MRW}) für das native 37 S-Hämocyanin und die Untereinheiten im oxygenierten und desoxygenierten Zustand bei den Wellenlängen 220, 221 und 222 nm. Es wurden sowohl die direkt aus den Spektren ablesbaren Werte angegeben als auch diejenigen, die sich nach Korrektur mit den entsprechenden Faktoren ergeben (siehe Text).

Θ_{MRW} (grad x cm²/dezimol) ist die auf eine mittlere Aminosäurerestmasse von 116 bezogene Elliptizität.

	220 nm	220 nm/ korr.	221 nm	221 nm/ korr.	222 nm	222 nm/ korr.
HC,ox	-5600		-5500		-5400	
HC,desox	-5000		-4900		-4900	
UE <u>a</u> ,ox	-7000	-4100	-7100	-4100	-7100	-4100
UE <u>a</u> ,desox	-6400	-3700	-6400	-3700	-6400	-3700
UE <u>d</u> ,ox	-6400	-6800	-6400	-6800	-6200	-6600
UE <u>d</u> ,desox	-4500	-4800	-4700	-5000	-4700	-5000
UE <u>e</u> ,ox	-6600	-5900	-6700	-6000	-6600	-6000
UE <u>e</u> ,desox	-6600	-5900	-6600	-5900	-6700	-6000
UE <u>f</u> ,ox	-3400	-3500	-3300	-3400	-3200	-3300
UE <u>f</u> ,desox	-3500	-3700	-3300	-3400	-3300	-3400
UE <u>g</u> ,ox	-4700	-5100	-4700	-5100	-4600	-5000
UE <u>g</u> ,desox	-4000	-4400	-4000	-4300	-3900	-4200
<u>bc</u> ,ox	-4100	-5500	-4000	-5400	-3800	-5100
<u>bc</u> ,desox	-3700	-4900	-3700	-4900	-3700	-5000

Tab. 14:

Aus den CD-Spektren errechnete α -Helix-Gehalte des 37 S-Hämocyanins und der Untereinheiten im oxygenierten und desoxygenierten Zustand.

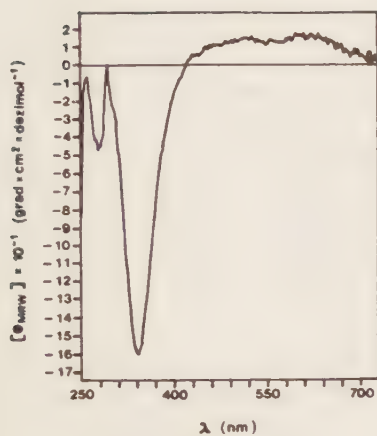
Für die Untereinheit f wurden wegen der ungewöhnlich niedrigen Elliptizitätswerte (siehe Tab. 13) keine α -Helix-Gehalte angegeben.

Die Berechnung erfolgte nach den empirischen Formeln von CHEN und YANG (1971) für die Wellenlängen 220, 221 und 222 nm aus den in Tab. 13 angegebenen Θ_{MRW} -Werten. Neben den direkt aus den Spektren berechneten Werten wurden auch die korrigierten Werte angegeben. Die letzten beiden Spalten enthalten die Mittelwerte aus den Werten für 220, 221 und 222 nm.

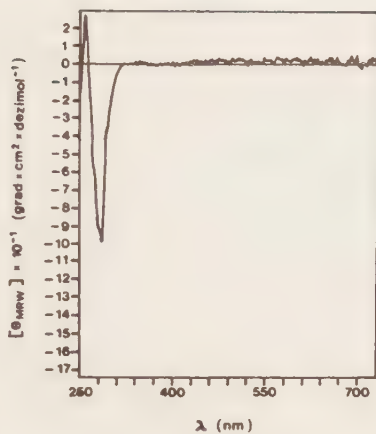
	220 nm	220 nm/ korr.	221 nm	221 nm/ korr.	222 nm	222 nm/ korr.	Mittel- wert	Mittel- wert/korr.
HC,ox	8,0		8,7		10,1		8,9	
HC,desox	5,8		6,6		8,4		6,9	
UE <u>a</u> ,ox	13,1	2,6	14,3	3,8	15,7	5,8	14,4	4,1
UE <u>a</u> ,desox	10,9	1,2	11,9	2,4	13,4	4,5	12,1	2,7
UE <u>d</u> ,ox	10,9	12,3	11,9	13,3	12,7	14,1	11,8	13,2
UE <u>d</u> ,desox	4,0	5,1	5,9	6,9	7,8	8,8	5,9	6,9
UE <u>e</u> ,ox	11,6	9,1	12,9	10,5	14,1	12,1	12,9	10,6
UE <u>e</u> ,desox	11,6	9,1	12,6	10,1	14,4	12,1	12,9	10,4
UE <u>g</u> ,ox	4,8	6,2	5,9	7,3	7,5	8,8	6,1	7,4
UE <u>g</u> ,desox	2,2	3,7	3,4	4,5	5,1	6,1	3,6	4,8
<u>bc</u> ,ox	2,6	7,7	3,4	8,4	4,8	9,1	3,6	8,4
<u>bc</u> ,desox	1,2	5,5	2,4	6,6	4,5	8,8	2,7	7,0

Auch im Spektralbereich von 250 - 730 nm werden individuelle Unterschiede der Untereinheiten erkennbar (Abb. 37). Dieser Bereich betrifft sowohl die optische Aktivität von Aminosäure-Seitenketten, die innerhalb des Moleküls auch von der näheren Umgebung beeinflusst werden kann, also Strukturänderungen in einem enger umgrenzten Bezirk, als auch die Sauerstoff-bindende Stelle selbst, die durch die drei Kupferbanden bei 340 nm, 505 nm und 622 nm repräsentiert wird.

Alle beim 37 S-Hämocyanin vorhandenen Banden sind auch bei den oxygenierten Untereinheiten erkennbar. Bei der Untereinheit f jedoch ist die Kupferbande bei 505 nm sehr schwach ausgebildet und diejenige bei 622 nm zeigt einen eigenartigen Verlauf (vgl. Peptidbande). Möglicherweise steht dies mit der Isolierung dieser Untereinheit in Zusammenhang (siehe Diskussion).

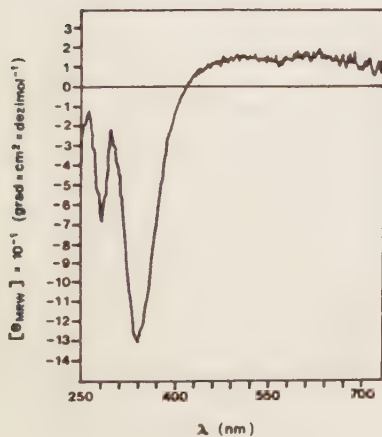


UE a,ox

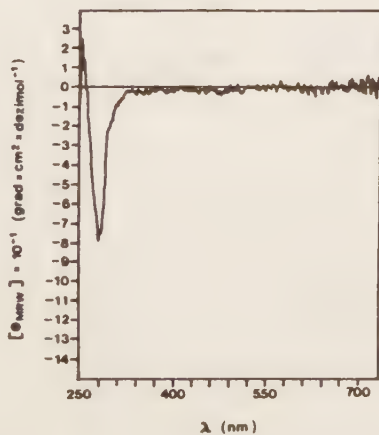


UE a,desox

Abb. 37 a

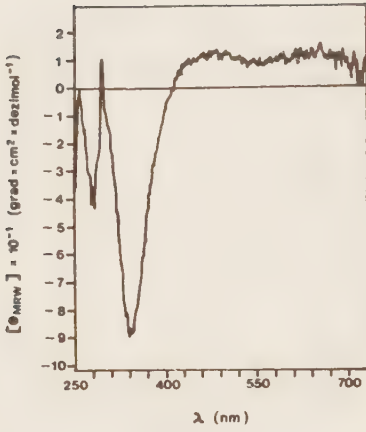


UE d,ox



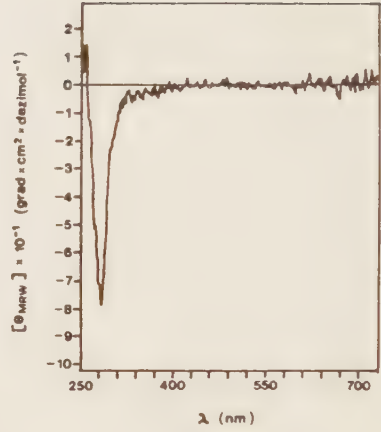
UE d,desox

Abb. 37 b

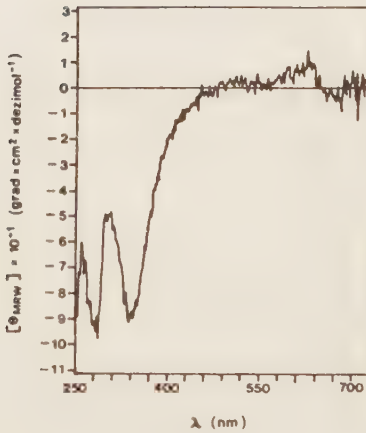


UE e,ox

Abb. 37 c

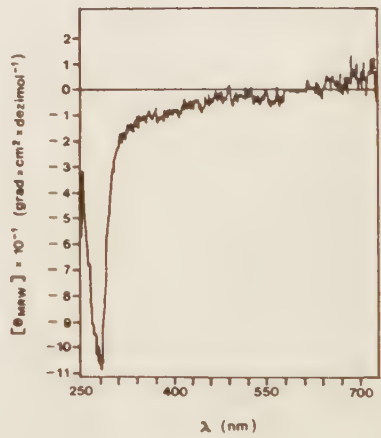


UE e,desox

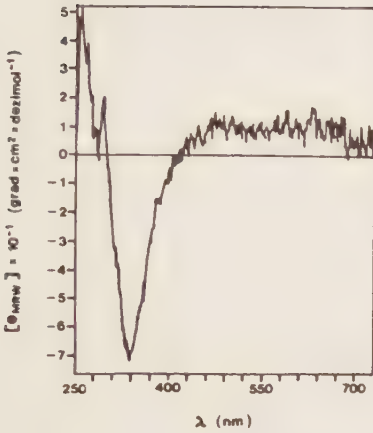


UE f,ox

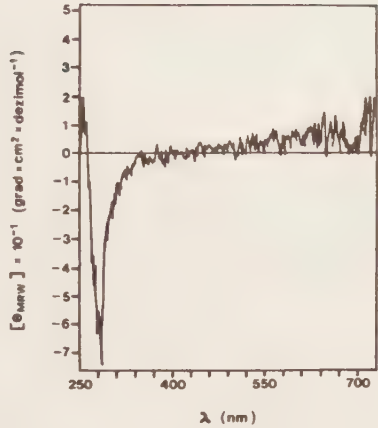
Abb. 37 d



UE f,desox

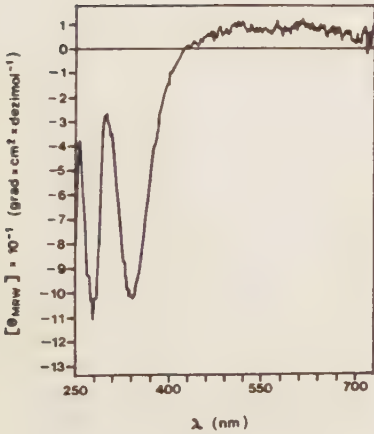


UE g,ox

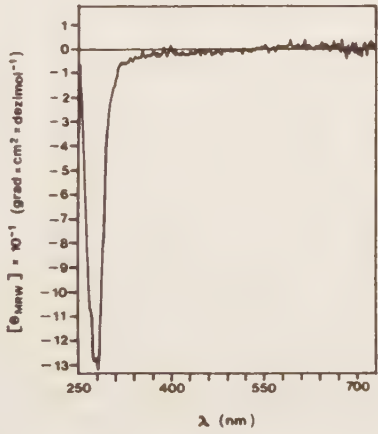


UE g,desox

Abb. 37 e



bc,ox



bc,desox

Abb. 37 f

Abb. 37:

CD-Spektren (nahe UV-Bereich und sichtbarer Bereich) der oxygenierten (links) und desoxygenierten (rechts) Untereinheiten.

a) UE a, b) UE d, c) UE e, d) UE f, e) UE g, f) Heterodimer bc.

Raumtemperatur; Oxygenierung mit Luft, Desoxygenierung mit 0,059 M NaHSO₃ im Puffer; Küvette: 1 cm, Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0; die Extinktion der Proteinlösungen wurde auf 1,0 eingestellt.

Θ_{MRW} ist die auf eine mittlere Aminosäurerestmasse von 116 bezogene Elliptizität.

Die direkt aus den Spektren erhaltenen und die korrigierten Elliptizitätswerte der 340 nm-Kupferbande können der Tabelle 15 entnommen werden. Die Untereinheit d besitzt nach Korrektur den höchsten Wert, Untereinheit g dagegen den niedrigsten.

Tab. 15:

Elliptizitätswerte (Θ_{NRW}) für 37 S-Hämocyanin und die Untereinheiten für die Bandenmaxima bei 257, 283 und 340 nm.

Für die Banden bei 257 und 283 nm sind die Werte für die oxygenierten und die desoxygenierten Moleküle angegeben. Θ_{NRW} -Werte, die sich nach Multiplikation mit den entsprechenden Korrekturfaktoren ergeben, wurden ebenfalls aufgeführt.

Θ_{NRW} (grad $\times$ cm²/dezi mol) ist die auf eine mittlere Aminosäurerestmasse von 116 bezogene Elliptizität.

	257 nm	257 nm/ korr.	283 nm	283 nm/ korr.	340 nm	340 nm/ korr.
HC,ox	- 4		- 47		-119	
HC,desox	+ 23		- 90			
UE <u>a</u> ,ox	- 7	- 4	- 48	- 28	-160	- 93
UE <u>a</u> ,desox	+ 27	+ 16	- 99	- 57		
UE <u>d</u> ,ox	- 12	- 13	- 68	- 72	-131	-140
UE <u>d</u> ,desox	+ 25	+ 27	- 79	- 84		
UE <u>e</u> ,ox	0	0	- 43	- 39	- 90	- 81
UE <u>e</u> ,desox	+ 14	+ 13	- 78	- 71		
UE <u>f</u> ,ox	- 60	- 62	- 98	-101	- 91	- 94
UE <u>f</u> ,desox	- 32	- 33	-109	-112		
UE <u>g</u> ,ox	+ 52	+ 56	- 2	- 2	- 72	- 78
UE <u>g</u> ,desox	+ 20	+ 22	- 74	- 80		
<u>bc</u> ,ox	- 38	- 51	-110	-148	-103	-138
<u>bc</u> ,desox	- 7	- 9	-132	-177		

Wesentlich stärker variieren die Elliptizitätswerte der 283 nm-Bande der oxygenierten Untereinheiten (Tab. 15). Die größte Intensität besitzt die Bande des Heterodimers bc, gefolgt von der Bande der Untereinheit f. Am kleinsten ist die 283 nm-Bande bei der Untereinheit g, gefolgt von derjenigen bei der Untereinheit a. Die Individualität der einzelnen Untereinheiten, die schon an den unterschiedlichen Intensitäten der CD-Banden bei 283 nm und 340 nm erkennbar ist, zeigt sich noch klarer, wenn man das Intensitätsverhältnis der 340 nm-Bande und der 283 nm-Bande betrachtet (Tab. 16).

Untereinheit	Θ_{MRW} (340 nm) / Θ_{MRW} (283 nm)
<u>a</u>	3,32
<u>d</u>	1,94
<u>e</u>	2,08
<u>f</u>	0,93
<u>g</u>	39,00
<u>bc</u>	0,93

Tab. 16:
Intensitätsverhältnis der 340 nm-Bande und der 283 nm-Bande bei den verschiedenen oxygenierten Untereinheiten.

Das Intensitätsverhältnis ist bei den Untereinheiten d und e praktisch gleich, bei der Untereinheit f und dem Heterodimer bc ebenfalls gleich, aber um die Hälfte niedriger als bei d und e. Die Untereinheit a besitzt einen auffallend hohen Wert, wogegen die Untereinheit g völlig aus dem Rahmen fällt, da hier nur die Spitze der 283 nm-Bande in den negativen Bereich ragt.

Auch die 257 nm-Bande läßt individuelle Unterschiede der oxygenierten Untereinheiten erkennen (Tab. 15). Bei den Untereinheiten a, d, f und dem Heterodimer bc werden keine positiven Werte erreicht, bei der Untereinheit e berührt die Bande die Nulllinie, wogegen sie bei der Untereinheit g einen ungewöhnlich hohen positiven Wert erreicht.

Bei den Spektren der desoxygenierten Untereinheiten a, d, e, g und dem Heterodimer bc sind wie beim 37 S-Hämocyanin die Kupferbanden vollständig verschwunden. Bei der Untereinheit f hingegen findet nur ein schleichender Anstieg zur Nulllinie hin statt, was als nicht vollständige Desoxygenierung gedeutet werden könnte. In allen Fällen erfährt die 283 nm-Bande bei Desoxygenierung einen Intensitätszuwachs. Daraus kann man ersehen, daß räumliche Änderungen von Seitenketten aromatischer Aminosäuren in Abhängigkeit von der Sauerstoffabgabe bzw. -anlagerung bei allen Untereinheiten stattfinden, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Tab. 17 gibt die Quotienten der Elliptizitätswerte im desoxygenierten und oxygenierten Zustand bei 283 nm an. Geringe Intensitätszunahmen der 283 nm-Bande findet man bei den Untereinheiten d, f und dem Heterodimer bc, eine Zunahme um etwa das Doppelte bei den Untereinheiten a und e. Den größten Zuwachs

der 283 nm-Bande beobachtet man bei Untereinheit g.

Untereinheit	$\theta_{MRW} (283 \text{ nm, desox}) / \theta_{MRW} (283 \text{ nm, ox})$
<u>a</u>	2,0
<u>d</u>	1,2
<u>e</u>	1,8
<u>f</u>	1,1
<u>g</u>	40,0
<u>bc</u>	1,2

Tab. 17:

Intensitätsverhältnis der 283 nm-Bande im reduzierten und oxygenierten Zustand bei den verschiedenen Untereinheiten.

Die 257 nm-Bande erfährt ebenfalls bei allen Untereinheiten eine Änderung bei Sauerstoffabgabe bzw. -anlagerung (Tab. 15). Bei den Untereinheiten a, d und e findet bei Desoxygenierung eine Zunahme von negativen Werten zu positiven Werten statt, bei der Untereinheit f und dem Heterodimer bc eine Zunahme von negativen Werten zu weniger negativen und bei der Untereinheit g eine Abnahme von einem höheren positiven Wert zu einem niedrigeren positiven Wert.

Aus all den oben genannten Unterschieden in den CD-Spektren der verschiedenen Untereinheiten geht klar ihre Heterogenität hervor, die sowohl die Raumstruktur als auch deren Änderung bei Oxygenierung bzw. Desoxygenierung und damit deren individuelle Funktion betrifft.

D. DISKUSSION

I. Die Primärstruktur von Vogelspinnen-Hämocyanin

1. Methoden und Probleme bei der Sequenzanalyse

Die erste Primärstruktur der β -Kette von Human-Hämoglobin wurde schon 1961 von BRAUNITZER et al. aufgeklärt, 1968 die des Hämyrthrins, des Atmungspigments eines Vertreters der Sipunculiden. Gründe, erst relativ spät auch Hämocyanine sequenzanalytisch zu untersuchen, können in ihrer enormen Molekülgröße und der Heterogenität ihrer Untereinheiten gesehen werden. 1977 gelang beim Vogelspinnen-Hämocyanin die Isolierung reiner Untereinheiten (SCHNEIDER et al., 1977). Damit erst war die Voraussetzung für sequenzanalytische Untersuchungen geschaffen. Von den 7 Untereinheiten a, b, c, f und g beim Hämocyanin der Vogelspinne Eurypelma californicum wurden in unserer Arbeitsgruppe zunächst die beiden Untereinheiten d und e für die Sequenzanalyse ausgewählt, die in ausreichender Menge relativ einfach gewonnen werden können. Die Sequenzanalyse der beiden Untereinheiten wurde von zwei Arbeitsgruppen in unserer Abteilung, die eine unterschiedliche Strategie verfolgten, angegangen. Während SCHNEIDER et al. (1983) zur Isolierung der Peptide vor allem Anionenaustauscher verwendeten und die Sequenzanalyse sowohl manuell als auch automatisch in Zusammenarbeit mit LOTT-SPEICH und HENSCHEN durchführte, benutzte die Arbeitsgruppe von SCHAR-TAU, der auch ich angehörte, Kationenaustauscher und fast ausschließlich eine manuelle Sequenziermethode. Kationenaustauscher ermöglichten Proteintrennungen in Harnstoff-haltigen Puffern im sauren pH-Bereich durchzuführen. In diesem bildet sich aus dem Harnstoff kein Cyanat, welches die Aminoendgruppen blockiert. SCHNEIDER setzte dagegen auf die Verwendung von ganz reinem Harnstoff.

Die gleichzeitige Sequenzanalyse der Untereinheiten d und e erwies sich bald als sehr vorteilhaft, da aufgefundene Sequenzhomologien die Einordnung von Peptiden in die Gesamtsequenz gegenseitig erleichterten. Nichtsdestoweniger sind die Gesamtsequenzen beider Untereinheiten in sich konsistent.

Ein großes Problem bei der Sequenzanalyse waren die geringen zur Verfügung stehenden Proteinmengen. Eine große Vogelspinne liefert durch Punktion des Herzens ca. 1 ml Hämolymphe. Dem entsprechen ca.

50 mg Hämocyanin, wovon wiederum 1/7 auf die Untereinheit d entfällt. Dabei müssen Verluste bei der Isolierung berücksichtigt werden. Für die Sequenzierung kamen daher nur Mikromethoden in Betracht. Da ein automatischer Flüssigphasensequenzator nicht zur Verfügung stand, wurde die manuelle Methode nach CHANG et al. (1978) benützt. Das dabei verwendete DABITC-Reagenz ermöglichte noch 2 nMol eines Peptids zu sequenzieren. Der Nachteil der sehr arbeitsintensiven manuellen Sequenzierung wurde durch die Möglichkeit, mehrere Peptide gleichzeitig abzubauen, wettgemacht.

Die Isolierung der für die Sequenzierung notwendigen reinen Peptide war aber früher der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Sequenzanalyse. Durch Einsatz der modernen Reversed-Phase-Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie konnte aber eine große Anzahl von reinen Peptiden in relativ kurzer Zeit isoliert werden. Fraktionen, die mehrere Peptide enthielten, wurden mit einem anderen Elutionssystem weiter aufgetrennt. Die zahlreich anfallenden Peptide konnten dann gleichzeitig abgebaut werden. Die Kombination von Peptidisolierung durch HPLC mit manueller DABITC-Sequenzierung erwies sich somit als überaus günstig.

Die Untereinheit d wird im nativen Zustand durch limitierte Trypsinolyse nur in zwei große Bruchstücke, d-Tn 34 und d-Tn 37, gespalten (SCHARTAU et al., 1981). Es konnte ein geeigneter Kationenaustauscher gefunden werden, der eine Trennung dieser großen Bruchstücke im sauren Milieu ermöglichte. Eine N-terminale Blockierung durch den Einfluß von Harnstoff wurde so vermieden (siehe oben).

Durch Bromcyan-Spaltung von d-Tn 34 und d-Tn 37 konnten die BrCN-Peptide, die aus der gesamten Untereinheit d erhalten wurden (SCHARTAU), diesen beiden Bruchstücken zugeordnet werden. Aus dem BrCN-Spaltgemisch von d-Tn 34 konnten bis auf Peptid 34-CB 3 alle kleineren BrCN-Peptide isoliert werden. Da die 3 großen BrCN-Peptide 34-CB 1, 34-CB 2 und 34-CB 7 in dem BrCN-Spaltgemisch der Untereinheit d gefunden worden waren (SCHARTAU) und eingeordnet werden konnten, wurde auf ihre Isolierung aus d-Tn 34 verzichtet. Da sämtliche potentiellen BrCN-Peptide isolierbar waren (34-CB 3 wurde ebenfalls im Spaltgemisch der UE d gefunden), mußte an allen Met-X-Bindungen Spaltung zumindest teilweise möglich sein. Durch SDS-Gelelektrophorese des Spaltgemisches von d-Tn 34 konnte jedoch ein Peptid mit einer molaren Masse von ca. 23000 nachgewiesen werden (DURST, 1981). Dieser Befund und die Beobach-

tung von SCHROEDER et al. (1969), daß an Met-Thr- und Met-Ser-Bindungen nur zu einem geringen Anteil gespalten wird, lassen vermuten, daß das Peptid mit Mr 23000 auf die schwer spaltbare Met-Ser-Bindung zwischen 34-CB 1 und 34-CB 2 zurückgeführt werden kann. Bei d-Tn 37 konnten von 8 BrCN-Peptiden bis auf 37-CB 5 alle isoliert werden. Das größte durch Ionenaustausch-Chromatographie isolierte BrCN-Peptid 37-CB 3 mit Mr von 23000 ist kein unvollständig gespaltenes BrCN-Peptid. Es enthält keinen weiteren Methioninrest, wie die Sequenzanalyse ergab. Die SDS-Gelelektrophorese des BrCN-Spaltgemisches von d-Tn 37 läßt aber Banden mit einer Mr größer als 23000 erkennen. Dies zeigt, daß auch bei d-Tn 37 die Bromcyan-Spaltung nicht quantitativ abläuft.

Die Trypsin-Spaltung von d-Tn 34 und d-Tn 37 hatte neben der Einordnung der Peptide in eines dieser Bruchstücke den Vorteil, daß das Spaltgemisch nicht allzu heterogen war. Die Isolierung der tryptischen Peptide aus der gesamten UE d wäre sehr viel schwieriger gewesen. Die große Bedeutung der Trypsin-Spaltung für die Sequenzaufklärung zeigt sich darin, daß 68 % der Gesamtsequenz (ohne Berücksichtigung von Nachspaltungen) unmittelbar durch die sequenzierten Abschnitte der tryptischen Peptide abgedeckt werden konnten.

Trypsin spaltet Lys-X- und Arg-X-Bindungen mit Ausnahme von Lys-Pro- und Arg-Pro-Bindungen, die nicht oder nur langsam gespalten werden. Dementsprechend wurde bei den zwei Lys-Pro-Bindungen in der UE d (Pos. 313-314 und 533-534) keine Spaltung beobachtet. Bei der Arg-Pro-Bindung in Pos. 249-250 fand dagegen Spaltung mit guter Ausbeute statt, was wohl durch die kleinen AS-Seitenketten in der Nähe der Spaltstelle erklärt werden kann (-Gly-Ser-Arg-Pro-Ala-Gly-). Die Arg-Pro-Bindung 598-599 wurde nur teilweise gespalten, wie die entsprechenden Peptide zeigen.

Trotz der Verwendung von TPCK-behandeltem Trypsin, das keine chymotryptische Aktivität mehr haben sollte, fand bei d-Tn 34 einmal Spaltung zwischen den AS-Resten von Tyrosin und Methionin (Pos. 199-200) und einmal Spaltung zwischen zwei Serinresten (Pos. 239-240) statt, bei d-Tn 37 dagegen eine Spaltung zwischen Asn(428) und Tyr(429). Solche "unspezifischen" Spaltungen wurden auch von HEILAND et al. (1976) nach der tryptischen Verdauung ribosomaler Proteine festgestellt. Möglicherweise beruhen diese auf chymotrypsinartiger Aktivität (INAGAMI und STURTEVANT, 1960), die von sog. ϕ -Trypsin, einem Autolyseprodukt

von Trypsin (KEIL-DLOUHA et al., 1971) herrühren könnte.

Der hohe Verlust vor allem an d-Tn 34 bei der Trennung von d-Tn 34 und d-Tn 37 durch den Ionenaustauscher CM-Sepharose CL-6B war Anstoß, die tryptische Spaltung des am Ionenaustauscher irreversibel gebundenen Peptidgemisches zu versuchen. Dabei konnten viele Peptide, die schon aus der Spaltung von gelöstem d-Tn 34 und d-Tn 37 hervorgegangen waren, wiedergefunden werden, andere dagegen waren auf diese Weise nicht isolierbar. Dies kann man wohl damit erklären, daß nach der Bindung der Polypeptidkette an den Ionenaustauscher nur bestimmte Bereiche dem Enzym zugänglich sind. Andererseits lieferte die Spaltung von d-Tn 34 und d-Tn 37 am Ionenaustauscher neue Peptide, die nach Spaltung in Lösung nicht gefunden worden waren. Die Bedeutung dieser Peptide für die Sequenzaufklärung war schon im Ergebnisteil besprochen worden.

Die Nachspaltung von BrCN-Peptiden und tryptischen Peptiden mit Trypsin, Chymotrypsin, Staphylococcus aureus V8-Protease oder Astacus-Protease ermöglichte in der Sequenzermittlung der Ausgangspeptide weiter voranzukommen oder deren gesamte Sequenz zu ermitteln. Auch in diesem Zusammenhang ist die Leistungsfähigkeit der Reversed-Phase-Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie und der manuellen Sequenziermethode nach CHANG bemerkenswert. So konnten wenige nMol eines Peptids nachgespalten werden, das Spaltgemisch getrennt und die entsprechenden Peptide sequenziert werden.

Während das verwendete Chromatographie-System eine Unterscheidung der DABTH-Aminosäuren Leucin und Isoleucin nicht zuließ, besteht dagegen kein Zweifel, daß es sich bei den Aminosäuren in Pos. 171 und 173 um Tryptophanreste handelt. Zwar konnten die entsprechenden Thiohydantoin-Derivate nicht nachgewiesen werden (vermutlich wegen der leichten Oxidierbarkeit dieser Aminosäure), aber in der AS-Analyse von Peptid 34-T 19 war eindeutig Tryptophan nachweisbar. Eine weitere Stütze ist das von SCHARTAU gefundene Peptid 34-CB-W 1, das mit His(174) beginnt und aus der Spaltung zwischen Trp(173) und His(174) hervorgeht, die durch leichte Oxidierbarkeit von Tryptophan ermöglicht wird (BLUMEN-THAL et al., 1975).

2. Charakteristika der Untereinheit d

Aus der vorliegenden vollständigen Primärstruktur der Untereinheit d ergibt sich bis auf das Aminosäurepaar Leucin und Isoleucin die exakte AS-Zusammensetzung. Hinsichtlich der Aminosäuren Asx, Ser, Ala, Gly, Tyr und Arg weicht diese von der früheren AS-Analyse (MARKL et al., 1979) stärker ab. Bemerkenswert ist der hohe Anteil von hydrophilen Aminosäuren (Abb. 38). Jedoch auch nicht polare Aminosäuren machen einen



Abb. 38:

Aminosäurezusammensetzung der Untereinheit d.

Die Mol-fraktion der verschiedenen Aminosäuren ist nach abfallender Hydrophobizität aufgetragen (Darstellung nach CANTOR und SCHIMMEL, 1980).

beachtlichen Anteil aus, was oft für größere globuläre Proteine charakteristisch ist. In diesen befinden sich die apolaren Aminosäuren häufig im Innern des Moleküls, die polaren dagegen an der Oberfläche. Diese treten mit dem umgebenden wässrigen Milieu und/oder mit anderen Molekülen in Wechselwirkung, was auch für den Kontakt der Hämocyanin-Untereinheiten von Bedeutung sein könnte. Teilt man die Aminosäuren nach ihrem hydrophilen Charakter, wie er durch die Werte von HOPP und WOODS (1981) definiert ist, willkürlich in fünf Gruppen ein und stellt demgemäß den Verlauf des hydrophilen bzw. des hydrophoben Charakters in der Polypeptidkette graphisch dar (Abb. 39), so fallen vor allem die über weite Bereiche starken Schwankungen im hydropathischen Charakter der Aminosäuren auf, die an einigen Stellen besonders ausgeprägt sind. Die hydrophoben "Täler" etwa in Pos. 169-177 und in Pos. 319-328 decken sich mit am aktiven Zentrum beteiligten Bereichen.

Eine bis jetzt bestehende Kontroverse über die relativen Molekülmassen von Arthropoden-Hämocyanin-Untereinheiten, wonach deren molare Massen

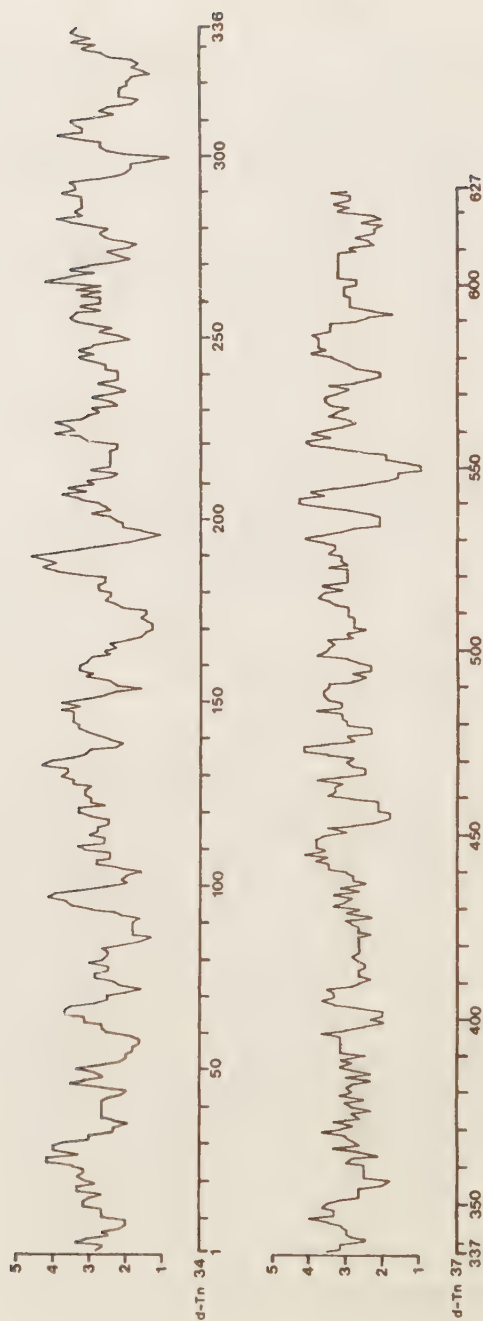


Abb. 39:

Verlauf des hydropathischen Charakters der Aminosäuren in der Untereinheit d.

Die Darstellung erfolgte nach der Einteilung der Aminosäuren in 5 Gruppen entsprechend ihres hydrophilen/hydrophoben Verhaltens nach HOPP und WOODS (1981). Zur Gruppe 1 gehören die stark hydrophoben Aminosäuren Met, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe und Trp, zu Gruppe 2 die schwächer hydrophoben Aminosäuren Ala, His und Cys, zu Gruppe 3 die ambivalenten Aminosäuren Gly, Pro und Thr, zu Gruppe 4 die schwächer hydrophilen Aminosäuren Ser, Asn und Gln und zu Gruppe 5 die stark hydrophilen Aminosäuren Asp, Glu, Arg und Lys. Es wurden jeweils die gleitenden Mittelwerte (Verschiebung um je eine AS-Position) des hydropathischen Charakters von Sechsergruppen aufgetragen.

mehr bei 50000 Da als bei 70000 Da liegen sollten, kann nun beendet werden. Die niedrigere Mr wurde damit begründet, daß Hämocyanine weniger SDS binden und daher im Gel langsamer wandern würden als andere Proteine, wodurch ihre Molekülmasse zu hoch erscheint (SALVATO und RICCHELLI, 1977; ZATTA und SALVATO, 1981). Eine erneute Untersuchung dieses Problems von GIELENS et al. (1981) zeigte jedoch keine verringerte Bindung von SDS. Aus der jetzt vorliegenden AS-Sequenz kann die exakte molare Masse der UE d zu 72232 Da, die der UE e zu 71361 Da (SCHNEIDER et al., 1983) berechnet werden. Diese Werte stimmen gut mit den in unserer Arbeitsgruppe durch SDS-Gelelektrophorese, Gelfiltration und Sedimentationsgleichgewichts-Zentrifugation bestimmten Werten überein (SCHNEIDER et al., 1977).

Für das um 45 Aminosäuren längere Bruchstück d-Tn 34 und das kürzere d-Tn 37 ergeben sich dagegen aus der Primärstruktur berechnete molare Massen von 38149 Da und 34047 Da. Die wahren molaren Massen verhalten sich also umgekehrt wie die mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese bestimmten (apparente molare Massen). PITT-RIVERS und IMPIOMBATO (1968) stellten fest, daß die Primärstruktur eines Proteins dessen SDS-Bindungsfähigkeit beeinflusst. So können Proteine mit vielen geladenen Aminosäureresten weniger SDS binden. Tatsächlich besitzt d-Tn 34 eine größere negative Gesamtladung, aber bezogen auf die Peptidlänge eine geringere Ladungsdichte und insgesamt mehr Leu-, Ile-, Val- und Ala-Reste (100) als d-Tn 37 (64). Eine anomal hohe Bindung von SDS bei d-Tn 34 würde dann dieses Protein im Gel schneller wandern lassen und so eine geringere molare Masse vortäuschen. Der gegenteilige Effekt könnte die im Gel beobachtete zu hohe molare Masse bei d-Tn 37 erklären.

Eine früher beobachtete Blockierung des N-Terminus der UE d (MARKL et al., 1979) konnte nicht bestätigt werden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin gesehen werden, daß der N-Terminus ins Innere des nativen Moleküls ragt und für das Endgruppenreagenz (z.B. DABITC) nicht zugänglich ist, wie dies beim denaturierten und carboxymethylierten Molekül der Fall sein müßte. Die Sequenz beginnt mit Threonin wie die α -Kette von Tachypleus-Hämocyanin (NEMOTO und TAKAGI, 1983), Untereinheit II von Limulus-Hämocyanin (YOKOTA und RIGGS, 1984) und verschiedenen Hämocyanin-Untereinheiten von Androctonus (JOLLES et al., 1981).

Die C-terminale Sequenz -His-Lys-His der UE d erinnert stark an den C-Terminus -His-Lys-Tyr-His der Säuger-Hämoglobin- β -Kette. Dies mag auf einem Zufall beruhen. Bemerkenswert ist jedoch eine funktionelle Ähnlichkeit der 19 terminalen Aminosäurereste der Hämoglobin- β -Kette und der 16 terminalen Aminosäurereste der UE d in der Sequenz, wenn man bei der UE d zwischen den AS-Resten 619 und 620 zwei Lücken und zwischen den AS-Resten 620 und 621 eine Lücke einfügt. Bis jetzt gibt es jedoch keinerlei Hinweise für eine eventuelle Beteiligung des C-terminalen Histidins der UE d am Bohr-Effekt wie dies bei Hämoglobin der Fall ist (KILMARTIN und ROSSI-BERNARDI, 1973).

Innerhalb der UE d existiert offensichtlich keine interne Sequenzhomologie. Gegenteilige Argumente, die eine interne Homologie möglich erscheinen ließen (ELLERTON et al., 1970; PICKETS et al., 1966; SALVATO et al., 1972; WAXMAN, 1975) haben sich nicht bestätigt.

Die Untereinheit d enthält in Pos. 169-174 die auffallende Sequenz -His-His-Trp-His-Trp-His-, welche auch in anderen Arthropoden-Hämocyaninen gefunden wurde (SCHNEIDER et al., 1982; NEMOTO und TAKAGI, 1983; YOKOTA et al., 1983). Spektroskopische Daten und andere Untersuchungen ließen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß dieser Sequenzabschnitt das aktive Zentrum oder ein Hauptteil dessen bei Eurypelma, Limulus und möglicherweise anderen Arthropoden-Hämocyaninen darstellt (SCHNEIDER et al., 1982; YOKOTA et al., 1983). Beispiele für derartige Hinweise sind Untersuchungen zur Photooxydation, die zeigten, daß sich gleichzeitig mit der Destruktion von Histidin die Sauerstoffbindungs-Kapazität verringert (ENGELBORGHs et al., 1968; WOOD und BANNISTER, 1968; TALLANDINI et al., 1975), Titration von nativem Hämocyanin und Apo-Hämocyanin (SALVATO et al., 1973; SALVATO et al., 1974) und schließlich die Löschung der Tryptophanfluoreszenz bei Oxygenierung (LOEWE, 1978). Modellvorstellungen, die aufgrund dieser eigentümlichen Primärstruktur aufgestellt wurden, bestanden zunächst darin, daß die vier Histidine in Pos. 169-174 mit ihren Imidazolringen die beiden Kupfer-Atome chelatartig binden sollten (SCHNEIDER et al., 1982; YOKOTA et al., 1983), wobei als möglicher Brückenligand zwischen den Kupfer-Atomen Tyrosin möglich erschien. Raumerfüllende Molekülmodelle ließen eine solche Struktur zu. Eine 4 Å-Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus interruptus-Hämocyanin zeigte dann aber, daß jedes Kupfer-Atom von drei Liganden umgeben ist. Es fand sich außerdem

kein Brückenligand im Protein (GAYKEMA et al., 1983). Aufgrund einer jetzt vorliegenden 3,2 Å-Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus inter-ruptus-Hämocyanin (GAYKEMA et al., 1984) lassen sich folgende Aussagen über den Bau des aktiven Zentrums machen: Alle 6 Kupfer-Liganden sind Histidinreste und ragen aus 4 α -Helices hervor, wobei jeweils 2 von derselben Helix ausgehen und einen Abstand von einer Helix-umdrehung haben. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu UE d (siehe Abschnitt D.I.3) ergibt sich durch Übertragung dieser Struktur auf die UE d folgendes: Das Histidin-Cluster von Pos. 169-174 ist tatsächlich, wie vorausgesagt, am Bau des aktiven Zentrums beteiligt, wobei His(170) und His(174) zwei aus einer α -Helix ragende Liganden sind. Der dritte Ligand wäre dann His(201). Für das zweite Kupfer-Ion kommen His(320) und His(324), die ebenfalls im Abstand einer Windung aus einer Helix ragen, in Betracht, der dritte Ligand ist His(360).

Die Sequenzanalyse gab keinen Hinweis auf Kohlenhydrat-Seitenketten in der UE d, wie dies bei Panulirus-Hämocyanin der Fall ist (VEREIJKEN et al., 1982). In der gesamten Sequenz existiert auch nur eine typische Bindungsstelle (-X-Asn-X-Ser(Thr)-) für N-glycosidisch gebundene Zuckerseitenketten, nämlich Asn(445). Bei früheren Kohlenhydrat-Analysen am nativen 37 S-Hämocyanin wurden jedoch Glucose, Mannose, Arabinose, Fucose und Glucosamin (Gesamtmenge ca. 0,9 %) nachgewiesen (MARKL et al., 1976). Analysen an den Untereinheiten lieferten ähnliche Ergebnisse (STRYCH, 1981). Genaue Untersuchungen an der UE e erbrachten aber keine Hinweise für kovalent gebundene Zuckerseitenketten. Dennoch scheint diese Untereinheit Zucker nicht-kovalent gebunden anzulagern (KELLERMANN, 1982). Dasselbe mag auch für die UE d gelten.

3. Vergleich mit der Untereinheit e und anderen homologen Proteinen

Die aus den Primärstrukturen abgeleiteten molaren Massen der Untereinheiten d und e unterscheiden sich kaum und stimmen mit früheren Untersuchungen überein. Die Untereinheit d ist aber um 6 Aminosäurereste länger als Untereinheit e. Die Aminosäure-Zusammensetzung der beiden Untereinheiten ist sehr ähnlich (Abb. 40). Beide Untereinheiten zeigen ein für Hämocyanine typisches Verteilungsmuster der verschiedenen Aminosäure-Gruppen (basisch, sauer, neutral, hydrophob). Dennoch

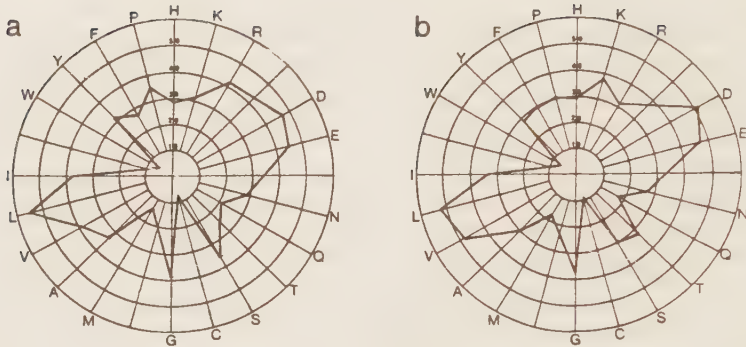


Abb. 40:

Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung der Untereinheiten d (a) und e (b).

Die Aminosäuren sind nach ihren chemischen Eigenschaften gruppiert (basisch: H, K, R; sauer: D, E; polar/ungeladen: N, Q, T, S, C, G; apolar (hydrophob): M, A, V, L, I, W, F, Y, P). Die hydrophoben aromatischen Aminosäuren (F, Y, W) sind von den hydrophoben aliphatischen abgesetzt. Art der Darstellung in Anlehnung an KATUNUMA et al. (1983).

sind einige Unterschiede bemerkenswert. Insgesamt besitzt die Untereinheit d einen Ladungsüberschuß von 19, Untereinheit e dagegen von 28 negativen Ladungen. Dies erklärt den niedrigeren isoelektrischen Punkt der UE e von 4,5 (gegenüber 5,4 bei UE d). Obwohl UE e saurer ist, gibt es dennoch 7 Positionen, an denen ein Lysin oder Arginin in UE e gegen Glutaminsäure in UE d ausgetauscht worden ist. So wurden in der Gegend um Pos. 515 drei basische Aminosäurereste (2 Lysin, 1 Arginin) in UE e gegen drei Glutaminsäurereste in UE d ersetzt. Auffallend ist auch die höhere Zahl von Lysinresten in der UE e (38 gegenüber 31 in UE d), die durch eine geringere Anzahl von Argininresten in der UE e (31 gegenüber 42 in UE d) kompensiert wird. Neben Unterschieden im Serin- und Threonin-Gehalt und einem deutlichen Unterschied im Valin-Gehalt (siehe Abb. 40) sollte vor allem der höhere Prolin-Gehalt in der UE d erwähnt werden, da Prolin in Proteinen häufig an einem Richtungswechsel der Polypeptidkette (Reverse Turn) beteiligt ist.

Abb. 41 zeigt die Sequenzen der UE d und UE e so nebeneinander angeordnet, daß ein Höchstmaß an Homologie entsteht. Im folgenden beziehen sich Positionsangaben, wenn nicht anders angegeben, auf die UE d. 354 Aminosäuren (56,5 % der UE d) sind identisch. Weitere 10 % der

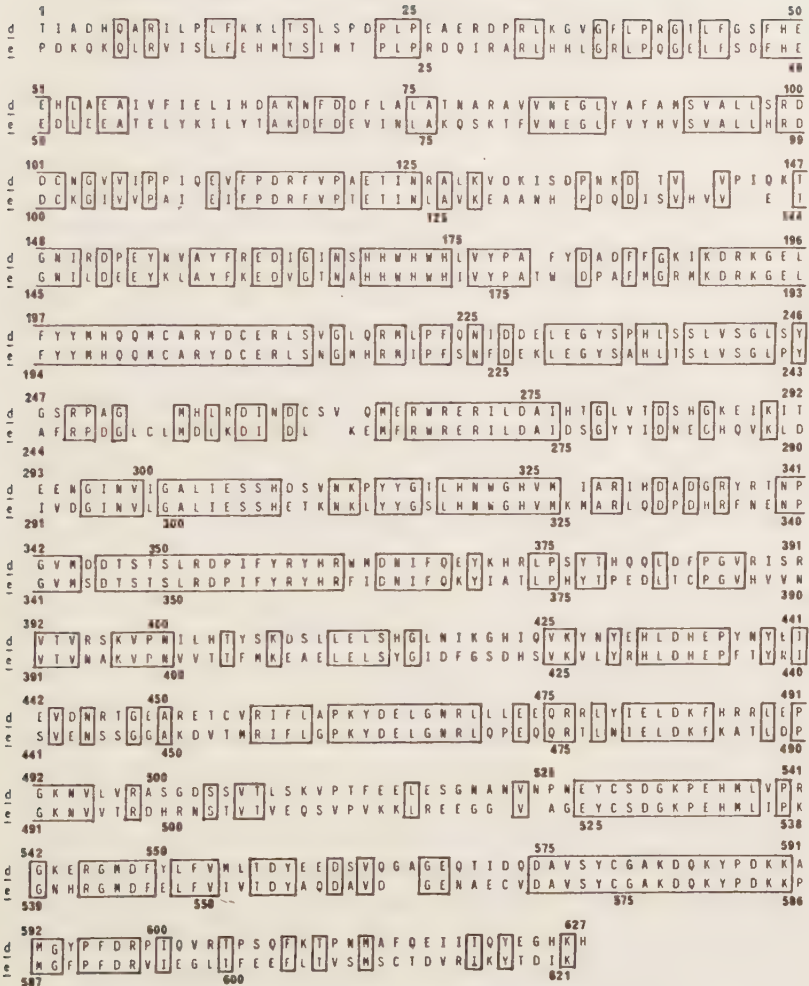


Abb. 41:
 Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der Untereinheiten d und e von Eurypelma californicum-Hämocyanin.
 Homologe Abschnitte sind durch Umrahmung gekennzeichnet. Die Aminosäure-Positionen in beiden Sequenzen wurden getrennt durchnummeriert. Lücken wurden zur Homologisierung eingefügt. Darstellung nach SCHARTAU et al. (1983).

AS-Positionen haben chemisch ähnliche Seitenketten und können als isofunktionelle (konservative) Austausche betrachtet werden, die vermutlich keinen großen Einfluß auf die Gesamtstruktur des Proteins haben. Die feststellbaren Sequenzunterschiede und die Tatsache, daß posttranslational keine feststellbaren Modifikationen an beiden Untereinheiten stattfinden (z.B. keine Zuckerseitenketten), bedeuten, wie schon früher vermutet wurde (MARKL et al., 1979), daß die Heterogenität ausschließlich auf diese Sequenzunterschiede zurückzuführen ist. Dies wiederum heißt, daß hier Proteindifferentiation (DICKERSON, 1977) vorliegt, also die Untereinheiten auf ein gemeinsames "Urgen" zurückgeführt werden können, das sich im Laufe der Stammesgeschichte mehrmals duplizierte. Die entstandenen Gen-Kopien konnten sich dann separat weiter verändern, womit die Entstehung verschiedener Untereinheiten mit unterschiedlicher Funktion im Molekülverband einherging. Ein vergleichbarer Differentiationsprozeß hatte beim Hämoglobin stattgefunden. Hier wurden zwischen den α - und β -Ketten 66 identische Aminosäurereste (45 % der β -Kette) gefunden (BRAUNITZER et al., 1961).

Bereiche teilweiser Homologie wechseln ab mit längeren Bereichen hoher Homologie mit kurzen Austausch-Abschnitten (einschließlich isofunktioneller Austausche). Solche Bereiche hoher Homologie findet man zwischen den Positionen 82-125, 147-179, 187-214, 265-279, 296-326, 340-370, 455-470, 527-542 und 574-600. Der längste Bereich absoluter Homologie ist der von Pos. 190-214. Er besteht aus einem stark hydrophilen N-terminalen Teil mit einem Cluster von drei basischen Aminosäureresten, an das sich ein stark hydrophober Teil mit drei aufeinander folgenden aromatischen Aminosäureresten anschließt (Abb. 39 und 41). Die jetzt vorliegende Röntgenstruktur-Analyse von Panulirus interruptus-Hämocyanin (siehe unten) zeigt, daß dieser Abschnitt einen der Kupfer-Liganden, His(201), enthält. Auch die übrigen Kupfer-Liganden His(320), His(324) und His(360) liegen in Bereichen absoluter Homologie.

Am geringsten ist die Homologie in Pos. 508-522. Auffallend ist auch die geringe Homologie des N-Terminus über einen langen Abschnitt bis etwa Pos. 80 und die geringe Homologie des C-Terminus (von Pos. 601 ab). Eine Sonderstellung der terminalen Regionen eines globulären Proteins scheint eine allgemeine Tendenz zu sein (THORNTON und SIBANDA, 1983).

Auffallend ist, daß von 39 Glycinresten in der Untereinheit d und 37 in Untereinheit e 30 in identischen Positionen sind. Da Glycin Knick-Strukturen (Reverse Turns) in Polypeptidketten ermöglicht (VENKATACHALAM, 1968), spricht die Konservierung der Glycinreste an so vielen Positionen für eine Übereinstimmung im Kettenverlauf der Untereinheiten d und e.

Ein weiterer Hinweis für eine große Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur der Untereinheiten d und e kann darin gesehen werden, daß beide Untereinheiten häufig auch in nicht streng homologen Bereichen bei Aminosäure-Austauschen den hydropathischen Charakter in einer bestimmten Position bewahren. Als Beispiele dafür seien genannt: Lys(14)/Glu(14), Ser(20)/Asn(20), Pro(31)/Ala(30). Austausche einer stark hydrophoben Aminosäure gegen eine stark hydrophile (z.B. Arg(151)/Leu(148)) sind mit 7 % relativ selten. Offensichtlich wurden nur solche Austausche toleriert, die keine wesentlichen Änderungen in der Wechselwirkung mit der näheren Umgebung im dreidimensional gefalteten Molekül und somit eine Destabilisierung dieser Struktur hervorrufen. Ob diese seltenen drastischen Veränderungen der hydropathischen Eigenschaften in einigen Positionen zu einem veränderten Verlauf der Polypeptidkette führten, oder ob sie durch ein oder mehrere Austausche in anderen Positionen kompensiert wurden (WYCKOFF, 1968), kann derzeit noch nicht beantwortet werden.

Neben einem intraspezifischen Sequenzvergleich homologer Untereinheiten ist neuerdings ein solcher Vergleich auch zwischen Hämocyanin-Untereinheiten verschiedener Arten möglich. Derartige Vergleiche können dazu dienen, Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Arten festzustellen. Inzwischen liegen umfangreichere Sequenz-Analysen bei der Untereinheit α aus Tachypleus tridentatus (NEMOTO und TAKAGI, 1983), der Untereinheit II aus Limulus polyphemus (YOKOTA und RIGGS, 1984), der Untereinheit a aus Panulirus interruptus-Hämocyanin (VEREIJKEN et al., 1984) und der Untereinheit b aus Astacus leptodactylus (VOLL, pers. Mitteilung) vor. Limulus und Tachypleus sind Vertreter der Pfeilschwanzkrebse (Xiphosuren) aus der Klasse der Merostomata und gehören mit Eurypelma, einem Vertreter der Arachnida, zum Unterstamm der Chelicerata. Panulirus und Astacus dagegen, Vertreter der Klasse der Crustacea, gehören zum Unterstamm der Diantennata. Zwischen allen Sequenzen besteht starke Homologie. Am meisten ist diese zwischen den Sequenzen

der Untereinheiten aus Eurypelma, Limulus und Tachypleus ausgeprägt. Vergleicht man damit bisher vorliegende Sequenzbereiche von Panulirus- und Astacus-Hämocyanin, so fällt auf, daß die Bereiche absoluter Homologie wesentlich kürzer sind, wie z.B. in Bereich von Pos. 199-214 (Abb. 42). Außerdem ist die Sequenz von Panulirus-Hämocyanin um ca.

Diantennata	A. lep. b	WV	HH	QL	TAR	F	D	S	E	R	L	S
	P. int. a	WV	HH	QL	TAR	F	D	F	E	R	L	S
Chelicerata	Eury d	YMH	QQ	MC	ARY	DC	E	R	L	S		
	Eury e	YMH	QQ	MC	ARY	DC	E	R	L	S		
	Lim II	YMH	QQ	MC	ARY	DC	E	R	L	S		
	Tachy α	YMH	QQ	MC	ARY	DC	E	R	L	S		

Abb. 42:

Sequenzvergleich im Bereich von Pos. 199-214 der Untereinheit d aus Eurypelma californicum mit den entsprechenden Sequenzbereichen der Hämocyanin-Untereinheiten aus den Diantennaten Astacus leptodactylus (= A. lep.), Panulirus interruptus (= P. int.) und den Cheliceraten Eurypelma californicum, UE e (= Eury e), Limulus polyphemus, UE II (= Lim II) und Tachypleus tridentatus, UE α (= Tachy α). Identische Sequenzbereiche sind umrandet.

50 Aminosäure-Positionen länger. Interessanterweise ist diese Verlängerung vor allem im N-terminalen Bereich festzustellen. Der N-Terminus der Untereinheit d wird um 5 Aminosäurereste überragt, zwischen Leu(16) und Thr(17) (bezogen auf UE d) muß zur Homologisierung eine Lücke von 21 Aminosäuren eingefügt werden. Dies erinnert an die relativ schwache Sequenzhomologie im N-terminalen Bereich zwischen UE d und UE e und ist ein weiterer Hinweis dafür, daß terminale Bereiche bei Proteinen oft weitaus stärker als andere Bereiche einer Änderung unterworfen sind. Es könnte möglich sein, daß diese Bereiche einerseits für die Funktion des Moleküls nur geringe Bedeutung besitzen, andererseits aber auf diese Bereiche im Rahmen einer Anpassung an veränderte Wechselwirkung mit der Umgebung (z.B. benachbarte Untereinheiten) ein höherer Selektionsdruck wirkt. Die Sequenzunterschiede bestätigen auf molekularer Ebene die aufgrund morphologisch-systematischer Untersuchungen gewonnenen Verwandtschaftsverhältnisse.

Die phylogenetische Verwandtschaft der Arthropoden-Hämocyanine dürfte sich insbesondere in einer ähnlichen Struktur des aktiven Zentrums zeigen. Für Panulirus interruptus-Hämocyanin wurde sie durch Röntgen-

struktur-Analyse aufgeklärt (GAYKEMA et al., 1984). In allen Sequenzen konnten an den entsprechenden Positionen Histidine nachgewiesen werden. Der -His-His-Trp-His-Trp-His- Sequenzbereich der Cheliceraten-Hämocyanine, für den ursprünglich diskutiert wurde, daß er allein am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt sein könnte, unter Beteiligung des nahe gelegenen Tyr(177) als Brückenligand (SCHNEIDER et al., 1982; YOKOTA et al., 1983), ist tatsächlich, wie oben erwähnt, am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt. Aber schon die Sequenz des entsprechenden Bereichs bei Panulirus zeigt, daß er nicht allein am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt sein kann, da nämlich His(172) hier durch Threonin ersetzt ist. Trp(171) ist dagegen bei Panulirus-Hämocyanin durch Val ersetzt. Auch im Sequenzbereich mit dem zweiten nah benachbarten Histidinpaar (Pos. 320-324), das für die Kupfer-Ligandierung verantwortlich ist, sind die Aminosäurereste von Tryptophan und Glycin bei Eurypelma, Limulus und Tachypleus durch Threonin und Alanin bei Panulirus ersetzt.

YOKOTA et al. (1983) nehmen an, daß das Enzym Tyrosinase und die Hämocyanine einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben. Bei aller Unsicherheit in dieser Frage ist aber dennoch bemerkenswert, daß in Pos. 277-281* die Sequenz -His-X-X-X-His- in der Tyrosinase (LERCH, 1978) vorhanden ist. Zwei weitere Histidine, die als Kupfer-Liganden in der Tyrosinase fungieren sollen, sind His(188) und His(193). Diese haben allerdings einen Abstand von 4 Aminosäure-Positionen. Daher lassen sich Variationen im Bau des aktiven Zentrums bei der Tyrosinase vermuten, wenn auch spektroskopische Daten dafür sprechen, daß dieses sehr ähnlich dem der Hämocyanine ist (GAYKEMA, 1984).

Die nun vorliegenden Sequenzen von Arthropoden-Hämocyaninen werfen erneut die Frage auf, ob zwischen Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaninen phylogenetische Beziehungen bestehen oder ob es sich um eine konvergente Entwicklung handelt. Jetzt vorliegende Teilsequenzen des Hämocyanins von Helix pomatia (SCHNEIDER, pers. Mitteilung) lassen eine entfernte Verwandtschaft beider Hämocyanin-Klassen als auch eine Verwandtschaft beider Hämocyanin-Klassen mit Tyrosinase möglich erscheinen. Ein vorläufiger phylogenetischer Stammbaum legt weniger

* Die Positionsangaben beziehen sich hier auf die Tyrosinase-Sequenz.

ein gemeinsames Urhämocyanin nahe, sondern vielmehr einen gemeinsamen Vorläufer der Hämocyanine und der Tyrosinase. Eine ähnliche Überlegung wurde auch von VAN HOLDE und MILLER (1982) geäußert.

II. Zur Sekundärstruktur von Vogelspinnen-Hämocyanin

1. Vorhersage aus der Primärstruktur

Es ist heute allgemein anerkannt, daß allein die Primärstruktur eines Proteins dessen Raumstruktur determiniert. Es sollte daher grundsätzlich möglich sein, die Raumstruktur eines Proteins aus der vorliegenden Primärstruktur zu bestimmen. Durch die Primärstruktur ist das mögliche Energieminimum, das ein Protein erreichen kann, festgelegt. Die Tertiärstruktur, die ein Protein in statu nascendi annimmt, ist dann diejenige, bei der ein Energieminimum auftritt. Aufgrund der vielen Freiheitsgrade eines großen Proteinmoleküls, die durch frei drehbare Bindungen im Kettenrückgrat und in den Seitenketten gegeben sind, ist die Berechnung dieses Minimums bis jetzt aber ein unlösbares Problem. So müßten bei einem Protein mit einer Länge von 100 Aminosäureresten bereits ca. 10^{48} verschiedene Konformationen in Erwägung gezogen werden (CANTOR und SCHIMMEL, 1980)! Dabei sind die Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium noch nicht berücksichtigt. Unter Zugrundelegung der Annahme, daß vor allem Nahwirkungen (short range interactions) innerhalb der Polypeptidkette für die Ausbildung der Sekundärstruktur verantwortlich seien (ARNON et al., 1971), wurden jedoch semiempirische Methoden zur Vorhersage entwickelt. Dabei erlangte die von CHOU und FASMAN (1978) entwickelte weite Verbreitung. Da eine computerisierte Version der Chou/Fasman-Vorhersage-Methode (NISHIKAWA, 1983) im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried zur Verfügung stand, konnte eine Berechnung der Sekundärstruktur für die Untereinheiten d und e durchgeführt werden.

Dabei interessierte zunächst die Frage nach den Sekundärstruktur-Anteilen in den Untereinheiten d und e und inwieweit die große Sequenz-homologie zwischen diesen zu ähnlichen Sekundärstruktur-Vorhersagen führen würde. Nach LEVITT und CHOTIA (1976) werden Proteine nach ihren α -Helix- und β -Faltblatt-Anteilen in 4 Gruppen eingeteilt:

1. α -Proteine enthalten fast ausschließlich α -Helix; 2. β -Proteine enthalten vor allem β -Faltblatt-Struktur; 3. $(\alpha + \beta)$ -Proteine enthalten beide Sekundärstruktur-Anteile, wobei diese sich nicht vermischen und getrennt aggregieren; 4. α/β -Proteine schließlich enthalten in etwa alternierende Anteile von α -Helix- und β -Faltblattstrukturen. Gemäß dieser Einteilung müßte man beide Untereinheiten in etwa zu Gruppe 4, den α/β -Proteinen, rechnen. Damit unterscheiden sich die bis jetzt untersuchten Hämocyanin-Untereinheiten wesentlich von den Atmungspigmenten Hämoglobin und Hämerythrin. Diese gehören zu den α -Proteinen mit hohem α -Helix-Gehalt (Hämoglobin ca. 85 %, Hämerythrin 79 %). Vergleicht man die Gesamtgehalte an α -Helix, β -Faltblatt, Reverse Turn und Coil (hohe + niedere Wahrscheinlichkeit), so findet man für beide Untereinheiten in etwa das folgende Verhältnis: α -Helix : β -Faltblatt : Reverse Turn : Coil = 4 : 2 : 2 : 2. Die ähnliche Primärstruktur scheint also mit ähnlichen Sekundärstruktur-Anteilen korreliert. Die UE d besitzt nach der Vorhersage (Tab. 11) aber einen leicht höheren α -Helix-Anteil (44,5 % im Vergleich zu 37,8 % in UE e). Eine leichte Heterogenität könnte also auch in den Sekundärstruktur-Anteilen vorhanden sein. Der Reverse-Turn-Gehalt ist nach der Vorhersage bei beiden Untereinheiten mit 19,6 % (UE d) und 19 % (UE e) praktisch gleich. Somit scheint eine ähnliche Tertiärstruktur der beiden Untereinheiten sehr wahrscheinlich. Aus der neuerdings vorliegenden Röntgenstruktur-Analyse von Panulirus interruptus-Hämocyanin (GAYKEMA et al., 1984) ergibt sich ein α -Helix-Anteil von 33 % und ein β -Faltblatt-Anteil von 28 %. Inwieweit aber diese Werte bei Panulirus auf die stark sequenzhomologen Untereinheiten d und e von Eurypelma übertragbar sind, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden.

Vergleicht man den Verlauf und die Übereinstimmung der Strukturanteile in ihrer Position bei beiden Untereinheiten, so fällt zunächst die geringe Übereinstimmung in der exakten Position auf (ca. 50 %). Diese wird aber etwas relativiert, wenn man bedenkt, daß zwar ein Teil dieser Diskrepanz auf konträre Voraussagen in bestimmten Positionen (z.B. Pos. 287-294 in UE d) zurückgeht, aber ein großer Teil auch auf mehr oder weniger großen Verschiebungen oder unterschiedlichen Längen von Strukturbereichen beruht, deren ungefähre Lage jedoch übereinstimmt. Daß derartige Unterschiede in der Vorhersage realen Unterschieden entsprechen, also eine Heterogenität der Untereinheiten bedeuten, kann nicht ausgeschlossen werden. Wenn Raumstrukturen in

der Evolution länger konserviert werden als Primärstrukturen (SCHULZ und SCHIRMER, 1979), scheint es aber unwahrscheinlich, daß eine α -Helix wie in Pos. 449-460 der UE d durch ein β -Faltblatt in UE e ersetzt wird. Dafür spricht auch die Vorhersage selber. Nach der ersten Vorhersage nämlich könnte in dieser Position in der UE d sowohl ein β -Faltblatt als auch eine α -Helix mit guter Wahrscheinlichkeit ausgebildet werden. Die Vorhersageregeln entscheiden jedoch im zweiten Schritt der Vorhersage (Auflösung der Überlappungen) zugunsten der α -Helix. Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, daß bei der UE e an dieser Stelle zugunsten eines β -Faltblatts entschieden wird, so nimmt die Wahrscheinlichkeit für ein β -Faltblatt auch in der UE d zu. Entsprechend der Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus interruptus-Hämocyanin (GAYKEMA et al., 1984) sollte in dieser Position tatsächlich ein β -Faltblatt vorhanden sein. Der kritische Vergleich von Sekundärstruktur-Vorhersagen an zwei sequenzhomologen Proteinen könnte sich somit als Methode zur Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit erweisen.

Folgende Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur der Untereinheiten d und e seien dagegen erwähnt: 1. In den N-terminalen, wenig sequenzhomologen, Bereichen etwa bis Pos. 85 scheinen α -helikale Strukturen vorzuherrschen. 2. In ca. 50 % der Fälle stimmen die Positionen von Reverse-Turn-Bereichen überein. Hier sind sehr häufig die Aminosäurereste von Prolin und Glycin beteiligt. Von 39 Glycinresten in UE d und 37 in UE e sind 30 in identischen Positionen, was wiederum für eine ähnliche Faltung der Polypeptidketten beider Untereinheiten spricht. 3. Etwa in Pos. 335-353 ist ein ausgedehnter Reverse-Turn-Bereich, in dem die Polypeptidkette vermutlich wiederholt an die Moleküloberfläche gelangt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß bei der nativen UE d die tryptische Spaltung in diesem Bereich (Pos. 336/337) stattfindet. Diese Gemeinsamkeiten sprechen für eine ähnliche Anordnung von Sekundärstruktur-Bereichen in beiden Untereinheiten.

Die Sequenzhomologie zwischen den Untereinheiten d und e und Kette a von Panulirus interruptus-Hämocyanin ist trotz der großen Distanz in der Evolution deutlich ausgeprägt. Man darf daher annehmen, daß die Raumstruktur in den Grundzügen gleich ist. Anhand der Abbildung 32 (Abschnitt C.II.1) können die vorhergesagten und die nach der 3,2 Å-Röntgenstruktur-Analyse (von P. i.-HC) der UE d zugeordneten α -Helix- und β -Faltblatt-Bereiche verglichen werden. In Pos. 1-100 werden

nur α -helikale Bereiche vorhergesagt, die Übereinstimmung mit der Röntgenstruktur-Analyse ist relativ gut. Die Tendenz zur Ausbildung der Helix H2 bzw. 1/3 scheint sehr stark zu sein, da die P_{α} -Werte an dieser Stelle sehr hohe positive Werte erreichen und es keine Interferenz mit positiven P_{β} -Werten gibt. Die Helices 1/4 und 1/5 bei Panulirus interruptus werden bei UE d als eine einzige lange, zusammenhängende Helix vorhergesagt. Weitere Beispiele für gute Übereinstimmung der Vorhersage mit der Röntgenstruktur-Analyse und dem Verlauf des P_{α} -Wertes sind die Helix-Paare 3/2 - H20 und 3/3 - H22. Bei den Paaren 1/7 - H5, 2/3 - H11, 2/5 - H13, 2/7 - H14, 3/1 - H15, 3/4 - H23 und 3/5 - H24 findet man Übereinstimmung, die Tendenz zur Ausbildung dieser Helices ist aber nach dem Verlauf der entsprechenden P_{α} - und P_{β} -Werte offenbar nicht so groß.

Auch hinsichtlich der β -Faltblattstruktur findet man einige Übereinstimmungen, die zudem durch auffallende Gipfel des P_{β} -Verlaufs ins Auge fallen: 1A - B1,B2, 1B - B3, 3A,3B - B11,B12, 3C - B13, 3H - B14 und 3J - B15. An diesen Stellen kann mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung dieser Struktur in der UE d gerechnet werden. In Pos. 150-260 findet man dagegen keine Übereinstimmung zwischen den vorhergesagten und den durch Röntgenstruktur-Analyse bestimmten Strukturen bei Panulirus trotz relativ hoher Sequenzhomologie. Betrachtet man dann aber den Verlauf der P_{β} -Werte in der UE d, so scheinen die vorhergesagten β -Faltblätter B4, B5 und B6 ein hohes Maß an Wahrscheinlichkeit zu besitzen. Andererseits aber sind in diesem Bereich 3 His-Liganden des aktiven Zentrums (His(170), His(174) und His(201)) lokalisiert. Diese befinden sich bei Panulirus interruptus in α -Helices (His(170) und His(174) in 2/1, His(201) in 2/2). Eine andere Struktur des aktiven Zentrums in UE d ist nicht wahrscheinlich, da derartige Bereiche eines Moleküls phylogenetisch sehr konservativ sein sollten. Eine ähnlich große Diskrepanz zwischen Vorhersage und Röntgenstruktur-Analyse ist in der zweiten Hälfte des ausgedehnten β -Faltblatt-Bereichs bei Panulirus-Hämocyanin in Pos. 385-510 vorhanden, sowie im C-terminalen Bereich der UE d. Es kann gegenwärtig nicht entschieden werden, ob es sich in diesen Fällen um eine Sekundärstruktur-Heterogenität handelt oder um falsche Vorhersagen.

Die erwiesene Unsicherheit aller Vorhersage-Methoden, über deren Maß an Treffsicherheit noch Uneinigkeit besteht (SCHULZ und SCHIRMER, 1979; NISHIKAWA, 1983) und die Möglichkeit, daß "Fernwirkungen" im

Proteinmolekül (entfernte Aminosäurereste in der linearen Sequenz) einen Einfluß auf die Sekundärstruktur haben (SCHIFFER und EDMUNDSON, 1967), verlangen große Vorsicht bei der Interpretation von Vorhersagedetails. Eine endgültige Bewertung der Vorhersagen für die Untereinheiten d und e muß daher einer künftigen Röntgenstruktur-Analyse vorbehalten bleiben.

2. CD-Spektroskopie: Raumstruktur und deren Änderung

Die CD-Spektroskopie ermöglicht Sekundärstruktur-Anteile eines Proteins zu bestimmen. Allerdings sind Aussagen über den Gehalt eines Proteins an bestimmten Strukturcharakteristika nur summarisch möglich. Im folgenden sollen zunächst methodische Schwierigkeiten angesprochen werden. Für die Berechnung des α -Helix-Gehaltes wurden die Elliptizitätswerte bei bestimmten Wellenlängen zugrunde gelegt. Diese Werte aber wiederum müssen aus den jeweiligen Circular dichroismus-Werten und der Proteinkonzentration berechnet werden. Für meine Untersuchung legte ich die spezifische Extinktion bei 280 nm nach LOEWE und LINZEN (1973) zugrunde, wobei der Umrechnungsfaktor nur für das intakte 37 S-Molekül gilt. Für die Untereinheiten wurden daher Korrekturfaktoren berechnet, die auf deren unterschiedlichen Tryptophan- und Tyrosin-Gehalten beruhen, mit Hilfe der AS-Analysen nach MARKL et al. (1979). Mit welchem großen Unsicherheitsfaktor diese aber behaftet sind, zeigt der Vergleich der AS-Analysen der Untereinheiten d und e mit den exakten, aus der Primärstruktur ablesbaren Werten. So soll die Untereinheit d nach der AS-Analyse 8 Tryptophan- und 23 Tyrosin-Reste enthalten. Aus der Sequenz wurden dagegen 5 und 31 bestimmt. Die durch CD-Spektroskopie erhaltenen Absolutwerte im α -Helix-Gehalt bei den Untereinheiten des Eurypelma-Hämocyanins sollten also mit Vorbehalt beurteilt werden.

Für das native Hämocyanin wurde ein erstaunlich niedriger α -Helix-Gehalt von ca. 10 % gefunden. Messungen anderer Untersucher ergaben bei Mollusken-Hämocyaninen für Octopus vulgaris 19 % α -Helix (VAN HOLDE, 1967) bzw. 21 % α -Helix (TAKESADA und HAMAGUCHI, 1968), für Arthropoden-Hämocyanine 24-28 % α -Helix bei Carcinus maenas (RICCHELLI et al., 1980) und 11 % α -Helix bei Cherax destructor (MARLBOROUGH, 1979). TAMBURRO et al. (1976) geben dagegen für Octopus vulgaris 17 % α -Helix

an, für Carcinus maenas 12 % und für Limulus polyphemus 14 %. Die Diskrepanz der Werte bei Carcinus maenas-Hämocyanin mag auf einem methodischen Fehler bei der Messung einer der Autoren beruhen. Der vorliegende Wert für das Eurypelma-Hämocyanin (ca. 10 %) lassen den niedrigeren Wert glaubwürdiger erscheinen. Die Mollusken-Hämocyanine scheinen einen im Schnitt höheren α -Helix-Gehalt zu besitzen. Der wesentlich höhere α -Helix-Gehalt, wie er nach der Chou/Fasman-Vorhersage (ca. 40 %) und der Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus (GAYKEMA et al., 1984) (ca. 35 % bei UE d nach Zuordnung der Sekundärstruktur-Bereiche) wahrscheinlich ist, steht dazu im Widerspruch. Nicht einmal die höchsten α -Helix-Werte, die durch CD-Messung bestimmt wurden, kommen diesen Werten nahe. Was die Röntgenstruktur-Analyse anbelangt, könnte man als Erklärung für eine solche Diskrepanz einen unterschiedlichen Sekundärstruktur-Gehalt beim gelösten (CD-Spektroskopie) und kristallisierten Protein annehmen. Nach bisherigen Erfahrungen ist dies jedoch unwahrscheinlich (RUPLEY, 1969). Eine kürzlich von WILLIAMS und HENDRICKSON (1984) durchgeführte Raman-spektroskopische Analyse von gelöstem und kristallisiertem Panulirus-Hämocyanin zeigt allerdings unterschiedliche α -Helix und β -Faltblatt-Gehalte (Kristall: 28-29 % α -Helix, 41-42 % β -Faltblatt; Lösung: 36-39 % α -Helix, 32-33 % β -Faltblatt). Nach dieser Arbeit sollte also sogar der α -Helix-Gehalt beim gelösten Protein höher sein.

Ungeachtet der Schwierigkeiten, die sich bei der Quantifizierung CD-spektroskopischer Daten ergeben können, ist die CD-Spektroskopie sehr gut geeignet Struktur-Änderungen anzuzeigen. So wurden bei Desoxygenierung des 37 S-Hämocyanins aus Eurypelma eine leichte Abnahme im α -Helix-Gehalt gefunden. FOSS (1963) konnte dagegen bei der Krabbe Carcinus maenas durch Viskosimetrie keine signifikante Änderung in der Raumstruktur feststellen. Diese Methode ist jedoch offensichtlich zu grob, um kleine Änderungen zu registrieren. RICCHELLI et al. (1980) konnten ebenfalls keinen Unterschied zwischen nativem Carcinus maenas-Hämocyanin und Kupfer-freiem feststellen. Demgegenüber fanden ELLERTON et al. (1977) durch CD-Messungen kleine, aber eindeutige Änderungen bei Desoxygenierung von Jasus edwardsii-Hämocyanin. Bei Mollusken-Hämocyaninen wurden ebenfalls keine oder nur kleine Änderungen bei Oxygenierung bzw. Desoxygenierung gefunden. So fanden zunächst COHEN und VAN HOLDE (1964) bei Loligo keine meßbaren Änderungen in der

Konformation. De PHILLIPS et al. (1969) aber konnte später eine leichte Änderung in der Raumstruktur durch Sedimentations-Analyse und CD-Spektroskopie nachweisen. Nur kleine Unterschiede im CD-Spektrum konnten von TAKESADA und HAMAGUCHI (1968) an Octopus vulgaris-Hämocyanin und von WOOD und DALGLEISH (1973) an Murex trunculus-Hämocyanin nachgewiesen werden. WOOD und DALGLEISH glauben aber eher Seitenketten-Effekte dafür verantwortlich machen zu müssen, als Änderungen in der Faltung der Polypeptidkette.

Eine vergleichende Untersuchung über den α -Helix-Gehalt bei verschiedenen Hämocyanin-Untereinheiten und über die Veränderungen bei Oxygenierung und Desoxygenierung wurden zum ersten mal in dieser Arbeit am Hämocyanin von Eurypelma californicum durchgeführt. Auf Schwierigkeiten bei der Bestimmung absoluter α -Helix-Werte wurde soeben hingewiesen. Inwieweit also die berechneten unterschiedlichen α -Helix-Werte der oxygenierten und desoxygenierten Untereinheiten Strukturunterschiede quantitativ widerspiegeln, kann gegenwärtig nicht eindeutig beantwortet werden. Für eine tatsächliche Heterogenität der Untereinheiten hinsichtlich einer Raumstruktur-Änderung spricht aber, daß die Änderung des CD-Spektrums bei Desoxygenierung sehr unterschiedlich ist. So findet man bei der Untereinheit d die stärkste Differenz zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Zustand, bei der Untereinheit e verändert sich das CD-Spektrum praktisch nicht.

Inwieweit die im CD-Spektrum beobachtete Heterogenität auf Artefakte durch die Isolierungsmethode zurückzuführen ist, kann nicht abgeschätzt werden. Bei den Untereinheiten a, d, und e, die nach der gleichen Methode isoliert wurden, würde die beobachtete Heterogenität im CD-Spektrum dann eine Heterogenität unterschiedlicher Empfindlichkeit denaturierenden Einflüssen gegenüber widerspiegeln. Immunologische Erkennbarkeit der isolierten Untereinheiten, ihre Fähigkeit Sauerstoff reversibel zu binden und die Möglichkeit, aus den isolierten Untereinheiten wieder vollständige Moleküle aufzubauen (MARKL et al., 1982) sprechen aber eher für ihre Unversehrtheit. Dennoch könnte die im Vergleich zu anderen Untereinheiten extrem schwache Peptidbande bei der Untereinheit f ein Hinweis für eine mögliche Denaturierung bei ihrer Isolierung sein. Das als Reduktionsmittel zugesetzte Cystein zur Spaltung von f-Dimeren könnte möglicherweise zur Spaltung von Disulfidbrücken geführt haben, die für den Erhalt der Raumstruktur wichtig sind.

Ob die bei den isolierten Untereinheiten beobachteten Unterschiede in der Sekundärstruktur und deren reversibler Veränderung beim Oxy- bzw. Desoxygenierungsvorgang auch im intakten Hämocyanin existieren und welche Bedeutung diese Heterogenität für die physiologische Funktion der Moleküle besitzt, kann gegenwärtig nicht beantwortet werden. Daß die Unterschiede im CD-Spektrum zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Zustand im Mittel den Unterschied, der beim Gesamtmolekül (37 S) festgestellt wurde, ergeben, kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß die Untereinheiten sich im Gesamtmolekül gleich oder ähnlich verhalten.* Ein ähnliches Ergebnis erbrachte der Vergleich von nativem Hämocyanin bei Callinectes sapidus (HAMLIN und FISH, 1977) und Cherax destructor (MARLBOROUGH, 1979) mit deren 5 S-Komponenten. Bei Dissoziation des Gesamtmoleküls konnte keine Veränderung im CD-Spektrum festgestellt werden. Allerdings wurden dort die verschiedenen Untereinheiten nicht voneinander getrennt.

Das CD-Spektrum des oxygenierten 37 S-Hämocyanins aus Eurypelma californicum im Bereich von 250 - 700 nm kann als typisch für Arthropoden-Hämocyanin angesehen werden. Es enthält zwei deutliche negative Banden bei 283 nm und 340 nm und zwei schwach positive Banden im sichtbaren Bereich bei 505 nm und 622 nm. Demgegenüber besitzen Mollusken-Hämocyanine drei CD-Banden im Sichtbaren, eine positive in der Nähe von 450 nm, eine negative bei 570 nm und eine positive bei 710 nm. Die 340 nm-Bande ist beiden Hämocyanin-Klassen gemeinsam. In dem Bereich zwischen 260 und 300 nm werden dagegen bei Mollusken-Hämocyaninen nur positive Banden beobachtet (NICKERSON und VAN HOLDE, 1971). Aus diesen Unterschieden schlossen diese Autoren auf grundlegende Unterschiede in der Sauerstoff-Bindungsstelle bei beiden Hämocyanin-Klassen. Durch Gauß'sche Kurvenanalyse konnte aber von TAMBURRO et al. (1976) gezeigt werden, daß mindestens vier Übergänge im Spektrum zwischen

* So errechnet sich z.B. für die oxygenierten Untereinheiten bei Wichtung des Anteils der einzelnen Untereinheiten am Aufbau des Gesamtmoleküls (4 a, 4 d, 4 e, 4 g, 2 bc, UE f nicht mitgerechnet) folgender Mittelwert für die korrigierten Elliptizitätswerte (Θ_{MRW} (grad x cm²/dezimol)) bei 222 nm: $-(4100 \times 4 + 6600 \times 4 + 6000 \times 4 + 5000 \times 4 + 5100 \times 4) : 20 = -5360$. Dieser Wert weicht nur geringfügig von dem Wert -5400 ab, der für das 37 S-Hämocyanin bestimmt wurde. Analog ergibt sich für die desoxygenierten Untereinheiten ein Mittelwert von -4780. Somit ist die Differenz zwischen den Mittelwerten für die oxygenierten und desoxygenierten Untereinheiten: $-(5360 - 4780) = -580$. Die Differenz in der Elliptizität für das oxygenierte und desoxygenierte native 37 S-Hämocyanin beträgt dagegen: $-(5400 - 4900) = -500$.

300 und 800 nm bei beiden Hämocyanin-Klassen vorkommen, also eine gewisse Ähnlichkeit im Spektrum besteht. Dies sollte auf einem grundsätzlich gleichen Bau des aktiven Zentrums beruhen, wobei die Unterschiede in einer veränderten Geometrie im Metall-Protein-Komplex bestünden. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen auch HIMMELWRIGHT et al. (1980) aufgrund chemischer und spektroskopischer Unterschiede zwischen Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaninen.

Die Bande bei 340 nm verschwindet bei Desoxygenierung völlig. Sie ist von Verschiebungen in der Bandenposition abgesehen, Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaninen gleichermaßen zu eigen und korrespondiert mit der Absorptionsbande bei 340 nm. Sie spiegelt daher eine beiden Hämocyanin-Klassen gemeinsame Grundstruktur des aktiven Zentrums beim oxygenierten Hämocyanin wider (NICKERSON und VAN HOLDE, 1971). Nach FREEDMAN et al. (1976) soll die 340 nm-Bande auf einen Ladungstransfer zwischen Stickstoff (eines Imidazolrings) und Cu(II) zurückgehen, nach EICKMAN et al. (1979) auf einen Peroxo-Kupfer-Ladungstransfer. Die Lage des Maximums dieser Kupfer-Bande scheint für verschiedene Hämocyanin-Gruppen charakteristisch. So liegen nach NICKERSON und VAN HOLDE (1971) die λ_{max} -Werte von Mollusken- und Arthropoden-Hämocyaninen bei 345 ± 2 bzw. bei 335 ± 1 nm. Limulus, ein Vertreter der phylogenetisch alten Pfeilschwanz-Krebse, besitzt dagegen das Absorptionsmaximum bei 340 nm. Bei dem Skorpion Androctonus mauretanicus, einem Vertreter der Spinnentiere, liegt das Maximum bei 339 nm (WITTERS et al., 1974). Das Vogelspinnen-Hämocyanin ähnelt also im Hinblick auf das Absorptionsmaximum der großen negativen CD-Bande mehr den Klassen der Arachnida und der Merostomata als der Klasse der Crustacea.

Die Lage der Absorptionsmaxima der positiven Kupfer-Banden konnte zu 505 und 622 nm bestimmt werden. Die Absorptionsmaxima der entsprechenden Banden bei Limulus polyphemus liegen bei 488 und 622 nm (NICKERSON und VAN HOLDE, 1971) und bei Androctonus mauretanicus bei 505 und 613 nm (WITTERS et al., 1974). Auch diese Übereinstimmung in jeweils einer Bande könnte Ähnlichkeiten in der Struktur des aktiven Zentrums sowohl innerhalb der Arachniden (Spinnen und Skorpione) als auch mit den Vertretern der Merostomata widerspiegeln. Nach den in Abschnitt D.I.3 genannten Sequenz-Befunden erscheint es möglich, den Hämocyaninen der Arachniden und Merostomata diejenigen der Crustaceen gegenüberzustellen. Die 622 nm-Bande soll nach AMUNDSEN et al.

(1977) auf d-d-Übergänge zurückgeführt werden können, FREEDMAN et al. (1976) und EICKMAN et al. (1979) schlagen dagegen vor, daß sowohl die 505 nm-Bande als auch die 622 nm-Bande auf einen Peroxo-Kupfer-Ladungstransfer zurückgehen.

Die in desoxygeniertem Eurypelma-Hämocyanin gefundene positive CD-Bande bei 257 nm müßte der bei anderen Hämocyaninen gefundenen Bande bei 251 ± 1 nm entsprechen. Die Verschiebung des Maximums dieser Bande scheint somit eine Eigenart der Arachniden-Hämocyanine darzustellen. Eine interessante Parallele kann im CD-Spektrum von Hämocyanin des Skorpions Androctonus australis gesehen werden (TOULME et al., 1976). Bestimmt man die Lage des Maximums der entsprechenden Bande anhand des in der Veröffentlichung dargestellten Spektrums, so ergibt sich ein Wert von 256 nm. Dennoch wird diese Bande vom Autor als 251 nm-Bande bezeichnet. Zur Klärung dieser Diskrepanz sollten daher erneute CD-Messungen an verschiedenen Arachniden-Hämocyaninen durchgeführt werden. Über den Ursprung der Bande, die sowohl Mollusken- wie Arthropoden-Hämocyaninen zu eigen ist, besteht Uneinigkeit. Da die Bande auch in Apo-Hämocyanin (Kupfer-freies Hämocyanin) vorhanden ist, kann es sich nicht um eine Kupfer-Bande handeln (DE PHILLIPS et al., 1969). Aus den gleichen Gründen sollte sich ein Ladungs-Transfer-Komplex zwischen Kupfer und dem Peptidrückgrat, wie er von NICKERSON und VAN HOLDE (1973) aufgrund eines Vergleichs von Hämocyanin mit dem Cu(II)-Ribonuclease-Komplex angenommen wurde, ausschließen lassen. Als mögliche Ursache für die Bande bei 251 (bzw. 257) nm kommen die Aminosäure-Seitenketten von Tyrosin, Cystein und Histidin in Betracht (BEYCHOK, 1966). Die Tatsache, daß die Bande sehr schwach ist, spricht aber nicht für eine Beteiligung der Disulfidbrücke des Cysteins (HORWITZ et al., 1970). Jedoch könnte eine schwache Bande von konformationell immobilisierter S-S-Brücke im Cystin herrühren (WOOD und DALGLEISH, 1973). TAMBURRO et al. (1976) schlugen Tyrosin-Übergänge als Ursache für die 251 nm-Bande vor. Die im Innern des Proteins verborgenen Seitenketten sollten die Unbeeinflussbarkeit der Bande gegenüber pH-Änderungen erklären. NICKERSON und VAN HOLDE (1971), die später einen Ladungs-Transfer-Komplex vorschlugen (siehe oben), diskutierten ursprünglich die Beteiligung von Histidin am Zustandekommen der 251 nm-Bande. Aus dem schnellen Verschwinden dieser Bande bei Behandlung des oxygenierten Hämocyanins mit N-Bromosuccinimid (NBS), das mit Histidin reagiert, und der größeren Menge an NBS, die für das Ver-

schwinden der 340 nm-Bande notwendig ist, schlossen die Autoren, daß die 251 nm-Bande nicht von einem Chromophor der Sauerstoffbindungsstelle herrührt, obwohl sie stark von ihrem Beladungszustand abhängt. Nach ELLERTON et al. (1977) ist die 251 (257) nm-Bande in Apo-Hämocyanin generell von größerer Intensität als im oxygenierten Hämocyanin, aber von geringerer Intensität als im desoxygenierten Hämocyanin. Daraus kann man auf einen engen räumlichen Kontakt der entsprechenden Seitenkette(n) zum aktiven Zentrum schließen. Der Wechsel in der optischen Aktivität, der durch Kupfer oder Sauerstoff hervorgerufen wird, ist auf eine Positionsänderung der Seitenkette zur Umgebung und auf die Ladungsverteilung im Kupfer-Sauerstoff-Komplex zurückzuführen (WOOD und DALGLEISH, 1973). Auch beim Vogelspinnen-Hämocyanin (37 S) konnte ein Intensitätsunterschied der 257 nm-Bande zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Zustand beobachtet werden. Die Bande erreicht aber im oxygenierten Hämocyanin nicht einmal einen positiven Wert (Abb. 34). Eine Parallele findet man beim Hämocyanin von Limulus polyphemus (TAMBURRO et al., 1976) und Androctonus australis (TOULME et al., 1976), während bei den Hämocyaninen von Carcinus maenas (TAMBURRO et al., 1976), Homarus americanus und Cancer borealis (NICKERSON & VAN HOLDE, 1971) auch im oxygenierten Zustand ein positiver Wert erreicht wird, bleibt hier die 251 nm-Bande unter der Nulllinie. Der Vergleich der Elliptizitäts-Werte bei 251 nm im oxygenierten und desoxygenierten Zustand bei den verschiedenen Untereinheiten ließ eine deutliche Heterogenität erkennen. Dabei nimmt die Untereinheit g eine Sonderstellung ein. Bei ihr wird im oxygenierten Zustand ein positiver Wert erreicht, der an Intensität den im reduzierten Zustand sogar übertrifft.

Da die Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus interruptus-Hämocyanin (GAYKEMA et al., 1984) zeigte, daß von den vier Histidinresten des -His-His-Trp-His-Trp-His- Sequenzabschnitts bei Eurypelma, Limulus und Tachypleus nur zwei an der Kupfer-Bindung beteiligt sind, könnten vielleicht die anderen zwei für die 251 nm-Bande verantwortlich sein. Da His(172) bei der UE d von Eurypelma und der entsprechende positions-homologe Histidinrest bei den anderen Untereinheiten von Eurypelma-Hämocyanin und beim Hämocyanin aus Limulus und Tachypleus bei Panulirus durch Threonin ersetzt ist, könnte His(169) als Ursache für die 257 (251) nm-Bande bei den Arthropoden-Hämocyaninen in Betracht kommen.

Die bei 283 nm im CD-Spektrum von Eurypelma-Hämocyanin deutlich ausgeprägte negative Bande, die ihre Entsprechung im Absorptions-Spektrum hat, wird auch bei allen anderen bisher untersuchten CD-Spektren von Arthropoden-Hämocyaninen gefunden. Mollusken-Hämocyanine enthalten dagegen im Bereich von 260 - 300 nm mehrere positive Banden (NICKERSON und VAN HOLDE, 1971). Als wahrscheinliche Ursache für die 283 nm-Bande können die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan in Betracht kommen (NICKERSON und VAN HOLDE, 1971; ELLERTON et al., 1977). Die Löschung der Tryptophan-Fluoreszenz bei Beladung des Moleküls mit Sauerstoff (LOEWE, 1978) deutet darauf hin, daß die Bande vermutlich auf Tryptophan zurückzuführen ist (WOOD und DALGLEISH, 1973). Bei Desoxygenierung tritt, wie auch bei den anderen Arthropoden-Hämocyaninen, eine deutliche Zunahme der Intensität der 283 nm-Bande auf. Dies spricht für eine räumliche Änderung von Tryptophan-Seitenketten, die dem aktiven Zentrum nahe benachbart sind, bei Oxygenierung bzw. Desoxygenierung (NICKERSON und VAN HOLDE, 1971). CD-Untersuchungen an Oxy-, Desoxy- und Apo-Hämocyanin von Jasus edwardsii bei verschiedenen pH-Werten und Gegenwart oder Fehlen von Mg^{++} -Ionen sprechen ebenfalls für eine enge Nachbarschaft von aromatischen Seitenketten und den Kupfer-Atomen des aktiven Zentrums (ELLERTON et al., 1977)

Aus den bis jetzt bekannten Aminosäure-Sequenzen und der Röntgenstruktur-Analyse an Panulirus interruptus-Hämocyanin könnte tatsächlich eine Beeinflussung von Tryptophan durch die reversible Beladung der Kupfer-Atome im aktiven Zentrum mit Sauerstoff als möglich angesehen werden. Dafür könnte Trp(173) der UE d von Eurypelma und die positions-homologen Tryptophanrest in den anderen Untereinheiten von Eurypelma und anderen Arthropoden-Hämocyanin-Untereinheiten mit größerer Wahrscheinlichkeit in Betracht kommen, da dieser Tryptophanrest auch in der UE a von Panulirus interruptus und der UE b von Astacus leptodactylus (VOLL, pers. Mitteilung), also Crustaceen-Hämocyaninen, an der positionshomologen Stelle vorhanden ist. Trp(d/171) ist dagegen durch einen Valin- und Trp(d/322) durch einen Threoninrest in den Crustaceen-Hämocyaninen ersetzt.

Bei den verschiedenen Untereinheiten des Eurypelma-Hämocyanins variieren sowohl die Relationen der 280 nm-Bande zur 340 nm-Bande als auch die Größenunterschiede der 283 nm-Bande im oxygenierten und desoxygenierten Molekül ganz beachtlich. Dies deutet auf erhebliche individu-

elle Unterschiede in der Beeinflußbarkeit der aromatischen Seitenketten durch die Beladung der Kupfer-Atome mit Sauerstoff hin.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Untereinheit d des Hämocyanins aus Eurypelma californicum wurde mit chemischen Agentien und enzymatisch gespalten und im Rahmen einer größeren Gemeinschaftsarbeit weitgehend mit Hilfe einer manuellen Mikromethode sequenziert.

2. Der N-Terminus ist nicht wie früher angenommen blockiert.

3. Die großen Bruchstücke d-Tn 34 und d-Tn 37, die aus der limitierten Trypsinolyse hervorgehen, wurden mit Hilfe eines Kationenaustauschers getrennt.

4. d-Tn 34 und d-Tn 37 wurden mit Bromcyan und Trypsin gespalten. Nach Isolierung der Peptide, die vorwiegend durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie erfolgte, wurden diese vollständig oder teilweise sequenziert. Einige Peptide wurden mit verschiedenen Enzymen (Trypsin, Chymotrypsin, Staphylococcus aureus V8-Protease, Astacus-Protease) nachgespalten.

5. Durch Trypsin-Spaltung des irreversibel am Ionenaustauscher gebundenen Gemisches von d-Tn 34 und d-Tn 37 wurden sowohl Peptide gefunden, die schon bei der Spaltung des gelösten d-Tn 34 und d-Tn 37 isoliert worden waren, als auch neue Peptide. Durch die Sequenzierung dieser Peptide konnten einige sequenzanalytisch schwierige Bereiche geklärt werden.

6. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von mir 504 Aminosäurepositionen (80 %) bestimmt. Es konnten keine posttranslationalen Modifikationen festgestellt werden. Der Vergleich mit der ebenfalls vorliegenden Aminosäuresequenz der Untereinheit e zeigt, daß die Untereinheiten-Heterogenität allein in der unterschiedlichen Aminosäuresequenz besteht, wobei die Sequenzhomologie 56 % beträgt. In weiteren 10 % der Positionen sind chemisch ähnliche Aminosäurereste zu finden (konservative Austausche). Die mittlerweile vorliegenden Teilsequenzen anderer Arthropoden-Hämocyanin-Untereinheiten (Limulus, Tachypleus, Astacus, Panulirus) lassen auch zu diesen ausgedehnte Sequenzhomologien erkennen.

7. Der -His-His-Trp-His-Trp-His- Sequenzbereich ist an der Bildung des aktiven Zentrums nicht allein beteiligt, wie der Vergleich mit der Tertiärstruktur des Panulirus interruptus-Hämocyanins zeigt. Neben His(170) und His(174) kommen als weitere Kupfer-Liganden His(201), His(320), His(324) und His(360) in Betracht.

8. Die Untereinheiten d und e sind nach der Sekundärstruktur-Vorhersage nach CHOU/FASMAN sog. α/β -Proteine mit alternierenden Anteilen von α -Helix- und β -Faltblattstruktur. Für Untereinheit d ergab sich ein α -Helix-Gehalt von 44,5 %, für Untereinheit e von 37,8 %. Für die β -Faltblatt- und Reverse-Turn-Anteile wurden bei beiden Untereinheiten je ca. 20 % berechnet. Die exakte Übereinstimmung der Sekundärstruktur-Bereiche bei beiden Untereinheiten beträgt für α -Helix, β -Faltblatt und Reverse Turn je ca. 50 %, die exakte Übereinstimmung in der Sekundärstruktur mit dem sequenzzhomologen Panulirus interruptus-Hämocyanin beträgt dagegen nur 25 %. Dennoch fällt in einigen Bereichen mit hohen P_{α} - und P_{β} -Werten (Tendenz der Aminosäuren zur Ausbildung von α -Helix- bzw. β -Faltblattstruktur) eine relativ gute Übereinstimmung auf.

9. Die CD-Spektren des nativen 37 S-Hämocyanins kennzeichnen dieses als typisches Arthropoden-Hämocyanin. Die CD-Spektren der isolierten Untereinheiten spiegeln deren Heterogenität wider. Diese zeigt sich in der sog. Peptidbande in der Gegend von 200 - 245 nm und in Banden, die die Struktur des aktiven Zentrums (340 nm) und von Aminosäureseitenketten (257 nm, 283 nm) betreffen. Oxygenierung und Desoxygenierung ruft bei den verschiedenen Untereinheiten unterschiedlich starke Änderungen in der Peptidbande, die Sekundärstrukturveränderungen anzeigt, hervor. Am stärksten ist diese Sekundärstrukturveränderung in der Untereinheit d ausgeprägt, praktisch nicht bei der Untereinheit e. Die Änderung der Sekundärstruktur bei Desoxygenierung und Oxygenierung am nativen 37 S-Hämocyanin scheint im Mittel den Änderungen der einzelnen Untereinheiten zu entsprechen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- AMUNDSEN, A.R., WHELAN, J. & BOSNICH, B. (1977): Biological analogues. On the nature of the binding sites of copper-containing proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 6730-6739.
- ANFINSEN, C.B. (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.
- ARNON, R., MARON, E., SELA, M. & ANFINSEN, C.B. (1971): Antibodies reactive with native lysozyme elicited by a completely synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1450.
- BEYCHOK, S. (1966): Circular dichroism of biological macromolecules. *Science* 154, 1288-1299.
- BLUMENTHAL, K.M. MOON, K. & SMITH, E.L. (1975): Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. II. Sequences of the cyanogen bromide peptides; the complete sequence of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 250, 3644-3654.
- BRAMHALL, S., NOACK, N., WU, M. & LOEWENBURG, J.R. (1969): A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 31, 146-148.
- BRAUNITZER, G., GEHRING-MÜLLER, R., HILSCHMANN, N., HILSE, K., HOBOM, G., RUDLOFF, V. & WITTMAN-LIEBOLD, B. (1961): Die Konstitution des normalen adulten Humanhäoglobins. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 325, 283-286.
- BRIDGEN, J. (1976): High sensitivity amino acid sequence determination. Application to proteins eluted from polyacrylamide Gels. *Biochemistry* 15, 3600-3604.
- CANTOR, C.R. & SCHIMMEL, P.R. (1980): *Biophysical Chemistry*, pt. I, The Conformation of Biological Macromolecules. Freeman, San Francisco.
- CHANG, J.Y., BRAUER, D. & WITTMAN-LIEBOLD, B. (1978): Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-NN-dimethylaminoazobenzene 4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Letters* 93, 205-214.
- CHEN, Y.H. & YANG, J.T. (1971): A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 1285-1291.
- CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D. (1974): Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13, No. 2, 211-222.
- CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D. (1978): Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-148.

- COHEN, L.B. & VAN HOLDE, K.E. (1964): Physical studies of Hemocyanins. II. A comparison of the hemocyanin and apohemocyanin of *Loligo pealei*. *Biochemistry* 3, 1809-1813.
- CRESTFIELD, A.M., MOORE, S. & STEIN, W.H. (1963): The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627.
- DICKERSON, R.E. (1977): Energy and evolution in the folding of proteins. In: *Molecular evolution and Polymorphism* (Kimura, M., Ed.). National Institute of Genetics, Mishima, Japan.
- DICKERSON, R.E. & GEIS, I. (1983): Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology. Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif.
- DRAPEAU, G.R., BOILY, Y. & HOUMARD, J. (1972): Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 247, 6720-6726.
- DRAPEAU, G.R. (1977): Cleavage at glutamic acid with staphylococcal protease. In: *Meth. Enzymol.* (Hirs, C.H.W., Timasheff, S.N., eds.), Vol. XLVII, pp. 189-191, Academic Press, New York.
- DURST, M. (1981): Proteinchemische Untersuchungen an der Kette d des Vogelspinnenhäemocyanins. Zulassungsarbeit, Universität München.
- EICKMAN, N.C., HIMMELWRIGHT, R.S. & SOLOMON, E.I. (1979): Geometric and electronic structure of oxyhemocyanin: Spectral and chemical correlations to met apo, half met, met, and dimer active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, No. 5, 2094-2098.
- ELLERTON, H.D., CARPENTER, D.E. & VAN HOLDE, K.E. (1970): Physical studies of hemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of *Cancer magister*. *Biochemistry* 9, 2225-2232.
- ELLERTON, H.D., COLLINS, L.B., GALE, J.S. & YUNG, A.Y.P. (1977): The subunit structure of the hemocyanin from the crayfish *Jasus edwardsii*. *Biophys. Chem.* 6, 47-57.
- ELLERTON, H.D., ELLERTON, N.F. & ROBINSON, H.A. (1983): Hemocyanin - a current perspective. *Prog. Biophys. molec. Biol.* 41, 143-248.
- ENGELBORGH, Y., WITTERS, R. & LONTIE, R. (1968): Photooxidation of *Helix pomatia* haemocyanin. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 76, 372-373.
- EYERLE, F. (1980): Versuche zur enzymatischen Spaltung an Vogelspinnen-Häemocyanin. Zulassungsarbeit, Universität München.
- FOSS, J.G. (1964): An interpretation of the rotatory dispersion data for hemocyanin and oxyhemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 79, 41-45.
- FREEDMAN, T.B., LOEHR, J.S. & LOEHR, T.M. (1976): A resonance Raman study of the copper protein hemocyanin. New evidence for the structure of the oxygen-binding site. *J. Am. chem. Soc.* 98, 2809-2815.

- GAYKEMA, W.P.J., VAN SCHAICK, E.J.M., SCHUTTER, W.G. & HOL, W.G.J. (1983): Crystal structure of *Panulirus interruptus* hemocyanin. Preliminary results at 4.0 Å resolution. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood, E.J., ed.). Life Chem. Rep., Suppl. 1, pp. 57-60, Harwood Academic Publ., Chur, London, New York.
- GAYKEMA, W.P.J., HOL, W.G.J., VEREIJKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J. & BEINTEMA, J.J. (1984): 3,2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. Nature 309, 23-29.
- GIELENS, C., DE JONGHE, C., PREAUX, G. & LONTIE, R. (1981): The binding of sodium dodecyl sulfate by molluscan and arthropodan hemocyanins in Tris buffer. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function (ed. Lamy, J. & Lamy, J.), pp. 109-116, Marcel Dekker, New York.
- GROSS, E. & WITKOP, B. (1962): Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. J. Biol. Chem. 237, 1856-1860.
- HAMLIN, L.M. & FISH, W.W. (1977): The subunit characterization of *Callinectes sapidus* hemocyanin. Biochim. biophys. Acta 491, 46-52.
- HEILAND, I., BRAUER, D. & WITTMANN-LIEBOLD, B. (1976): Primary structure of Protein L10 from the large subunit of *Escherichia coli* ribosomes. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1751-1770.
- HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN, N.C., LU BIEN, C.D. & SOLOMON, E.I. (1980): Chemical and spectroscopic comparison of the binuclear copper active site of mollusc and arthropod hemocyanins. J. Am. Chem. Soc. 102, 5378-5388.
- HOPP, T.P. & WOODS, K.R. (1981): Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 3824-3828.
- HORWITZ, J., STRICKLAND, E.H. & BILLUPS, C. (1970): Analysis of the vibrational structure in the near-ultraviolet circular dichroism and absorption spectra of tyrosine derivatives and ribonuclease-A at 77°K. J. Am. Chem. Soc. 92, 2119-2129.
- INAGAMI, T. & STURTEVANT, J.M. (1960): Nonspecific catalyses by α -chymotrypsin and trypsin. J. Biol. Chem. 235, 1019-1023.
- INGLIS, A., MCKERN, N., ROXBURGH, C. & STRIKE, P. (1980): Cleavage of proteins at aspartic acid residues using dilute acid. In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis (Birrr, C., ed.) (Proceedings of the 3rd International Conference on Solid Phase Methods in Protein Sequence Analysis), pp. 329-343, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

- JOLLES, J. & JOLLES, P. (1981): N-terminal sequences and antigenic purity of isolated subunits from *Androctonus australis* hemocyanin. In: *Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function* (ed. Lamy, J. & Lamy, J.), pp. 305-313, Marcel Dekker, New York.
- KATUNUMA, N., WAKAMATSU, N., TAKIO, K., TITANI, K. & KOMINAMI, E. (1983): Structure, function, and regulation of endogenous thiol proteinase inhibitor. In: *Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects* (ed. Katunuma, N., Umezawa, H. & Holzer, H.), pp. 135-145, Japan Scientific Societies Press, Tokyo / Springer-Verlag, Berlin.
- KEIL-DLOUHA, V., ZYLBER, N., IMHOFF, J.-M., TONG, N.-T. & KEIL, B. (1971): Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS Letters* 16, 291-295.
- KELLERMANN, J. (1982): Über das Vorkommen von Kohlenhydraten in der Kette e des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Diplomarbeit, Universität München.
- KILMARTIN, J.V. & ROSSI-BERNARDI, L. (1973): Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates. *Physiol. Rev.* 53, 836-890.
- KLIPPENSTEIN, G.L., HOLLEMAN, J.W. & KLOTZ, I.M. (1968): The primary structure of *Golfingia gouldii* hemerythrin. Order of peptides in fragments produced by tryptic digestion of succinylated hemerythrin. Complete amino acid sequence. *Biochemistry* 7, 3868-3878.
- KRATZIN, H., YANG, C., KRUSCHE, J.U. & HILSCHMANN, N. (1980): Präparative Auftrennung des tryptischen Hydrolysats eines Proteins mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Die Primärstruktur einer monoklonalen L-Kette vom K-Typ, Subgruppe I. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1591-1598.
- KRAUHS, E., DÖRSAM, H., LITTLE, M., ZWILLING, R. & PONSTINGL, H. (1982): A protease from *Astacus fluviatilis* as an aid in protein sequencing. *Anal. Biochem.* 119, 153-157.
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685.
- LAMY, J., LAMY, J. & WEILL, J., MARKL, J., SCHNEIDER, H.-J. & LINZEN, B. (1979): Hemocyanins in spiders, VII. Immunological comparison of the subunits of *Eurypelma californicum* hemocyanin. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 889-895.
- LAMY, J., LAMY, J., BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. (1980): Structure, function, and assembly in the hemocyanin system of the scorpion *Androctonus australis*. *Biochemistry* 19, 3033-3039.
- LAMY, J., BIJLHOLT, M.M.C., SIZARET, P.-Y., LAMY, J. & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1981): Quaternary structure of scorpion (*Androctonus australis*) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy. *Biochemistry* 20, 1849-1856.

- LAMY, J.N. (1983): Immunological approach to the structure and evolution of hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood, E.J., ed.). Life Chem. Rep., Suppl. 1, pp. 15-26, Harwood Academic Publ., Chur, London, New York.
- LERCH, K. (1978): Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3635-3639.
- LEVITT, M. & WARSH, A. (1975): Computer simulation of protein folding. Nature 253, 694-698.
- LEVITT, M. & CHOTIA, C. (1976): Structural patterns in globular proteins. Nature 261, 552-558.
- LEVITT, M. (1978): Conformational preferences of amino acids in globular proteins. Biochemistry 17, 4277-4285.
- LINZEN, B. (1983): Subunit heterogeneity in arthropodan hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (WOOD, E.J., ed.). Life Chem. Rep., Suppl. 1, pp. 27-38, Harwood Academic Publ., Chur, London, New York.
- LOEWE, R. & LINZEN, B. (1973): Hemocyanins in spiders, I. Subunits and stability region of *Dugesiella californica* haemocyanin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 182-188.
- LOEWE, R. & LINZEN, B. (1975): Haemocyanins in spiders, II. Automatic recording of oxygen binding curves, and the effect of Mg^{++} on oxygen affinity, cooperativity, and subunit association of *Cupiennius salei* haemocyanin. J. Comp. Physiol. 98, 147-156.
- LOEWE, R., SCHMID, R. & LINZEN, B. (1977): Subunit association and oxygen-binding properties in spider hemocyanins. In: Structure and Function of Haemocyanin (ed. Bannister, J.V.), pp. 50-54, Springer-Verlag, Berlin.
- LOEWE, R. (1978): Hemocyanins in spiders, V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. J. Comp. Physiol. 128, 161-168.
- LOTTSPEICH, F. (1980): Identification of the phenylthiohydantoin derivatives of amino acids by high pressure liquid chromatography, using a ternary, isocratic solvent system. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829-1834.
- MARKL, J., SCHMID, R., CZICHOS-TIEDT, S. & LINZEN, B. (1976): Haemocyanins in spiders, III. Chemical and physical properties of the proteins in *Dugesiella* and *Cupiennius* blood. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1713-1725.
- MARKL, J., STRYCH, W., SCHARTAU, W., SCHNEIDER, H.-J., SCHÖBERL, P. & LINZEN, B. (1979): Hemocyanins in spiders, VI. Comparison of the polypeptide chains of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 639-650.

- MARKL, J., KEMPTER, B., LINZEN, B., BIJLHOLT, M.M.C. & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1981): Hemocyanins in spiders, XVI. Subunit topography and a model of the quaternary structure of *Eurypelma hemocyanin*. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1631-1641.
- MARKL, J. & KEMPTER, B. (1981): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. In: Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function (ed. Lamy, J. & Lamy, J.), pp. 125-137, Marcel Dekker, New York.
- MARKL, J., DECKER, H., LINZEN, B., SCHUTTER, W.G. & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1982): Hemocyanins in spiders, XV. The role of the individual subunits in the assembly of *Eurypelma hemocyanin*. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 73-87.
- MARLBOROUGH, D.I. (1979): Spectroscopic studies on the urea denaturation of hemocyanin from the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Archs. Biochem. Biophys. 196, 248-254.
- MAURER, H.R. (1971): Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- NEMOTO, T. & TAKAGI, T. (1983): Primary structure of *Tachyplesus tridentatus* hemocyanin α chain. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood, E.J., ed.). Life Chem. Rep., Suppl. 1, pp. 89-92, Harwood Academic Publ., Chur, London, New York.
- NICKERSON, K.W. & VAN HOLDE, K.E. (1971): A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin - I. Circular dichroism and absorption spectra. Comp. Biochem. Physiol. 39 B, 855-872.
- NICKERSON, K.W. & VAN HOLDE, K.E. (1973): A circular dichroic study of Cu(II)-ribonuclease complexes. J. Biol. Chem. 248, 2022-2030.
- NISHIKAWA, K. (1983): Rechenprogramm mit Kommentar zur Sekundärstruktur-Vorhersage nach Chou/Fasman. Gespeichert auf Magnetplatte der Abteilung für Strukturforschung (Prof. Dr. Huber) des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried.
- DE PHILLIPS, H.A., NICKERSON, K.W., JOHNSON, M. & VAN HOLDE, K.E. (1969): Physical studies of hemocyanins. IV. Oxygen-linked disassociation of *Loligo pealei* hemocyanin. Biochemistry 8, 3665-3672.
- PICKETT, S.M., RIGGS, A.F. & LARIMER, J.L. (1966): Lobster hemocyanin: Properties of the minimal functional subunit and of aggregates. Science 151, 1005-1007.
- PITT-RIVERS, R. & IMPIOMBATO, F.S.A. (1968): The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. Biochem. J. 109, 825.
- REDFIELD, A.C. (1930): The equilibrium of oxygen with the hemocyanin of *Limulus polyphemus* determined by a spectrophotometric method. Biol. Bull. 58, 238-255.

- RICCHELLI, F., SALVATO, B., FILIPPI, B. & JORI, G. (1980): Conformational changes of *Carcinus maenas* hemocyanin induced by urea. *Archs. Biochem. Biophys.* 202, 277-288.
- RUPLEY, J.A. (1969): The comparison of protein structure in the crystal and in solution. In: *Structure and Stability of Biological Macromolecules* (ed. Timasheff, S. & Fasman, G.). Marcel Dekker, New York.
- SALNIKOW, J., LEHMANN, A. & WITTMANN-LIEBOLD, B. (1981): Improved automated solid-phase microsequencing of peptides using DABITC. *Anal. Biochem.* 117, 433-442.
- SALVATO, B., SARTORE, S., RIZZOTTI, M. & GHIRETTI-MAGALDI, A. (1972): Molecular weight determination of polypeptide chains of molluscan and arthropod hemocyanins. *FEBS Letters* 22, 5-7.
- SALVATO, B., ZATTA, P., GHIRETTI-MAGALDI, A. & GHIRETTI, F. (1973): On the active site of hemocyanin. *FEBS Letters* 32, 35-36.
- SALVATO, B., GHIRETTI-MAGALDI, A. & GHIRETTI, F. (1974): Acid-base titration of hemocyanin from *Octopus vulgaris* Lam. *Biochemistry* 13, 4778-4783.
- SALVATO, B. & RICCHELLI, F. (1977): The minimal subunit of arthropod hemocyanin. In: *Structure and Function of Haemocyanin* (ed. Bannister, J.V.), pp. 113-121, Springer-Verlag, Berlin.
- SCHARTAU, W., SCHNEIDER, H.-J., STRYCH, W., EYERLE, F. & LINZEN, B. (1981): Studies on the primary structure of *Eurypelma* hemocyanin. In: *Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function* (ed. Lamy, J. & Lamy, J.), pp. 327-333, Marcel Dekker, New York.
- SCHARTAU, W., EYERLE, F., REISINGER, P., GEISERT, H., STORZ, H. & LINZEN, B. (1983): Hemocyanins in spiders, XIX. Complete amino-acid sequence of subunit d from *Eurypelma californicum* hemocyanin, and comparison to chain e. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 1383-1409.
- SCHIFFER, M. & EDMUNDSON, A.B. (1967): Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7, 121-135.
- SCHNEIDER, H.-J., MARKL, J., SCHARTAU, W. & LINZEN, B. (1977): Hemocyanins in spiders, IV. Subunit heterogeneity of *Eurypelma* (*Dugesiella*) hemocyanin, and separation of polypeptide chains. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1133-1141.
- SCHNEIDER, H.-J., SCHARTAU, W., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1980): Hemocyanins in spiders, X. Limited proteolysis of chain e of *Eurypelma* hemocyanin and partial sequence of two large fragments. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1211-1216.

- SCHNEIDER, H.-J., ILLIG, U., MÜLLER, E., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1982): Hemocyanins in spiders, XVII. A presumptive active-site sequence of arthropodan hemocyanins. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 487-492.
- SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., FELDMAIER, G., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. & HENSCHEN, A. (1983): Hemocyanins in spiders, XVIII. Complete amino-acid sequence of subunit e from *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1357-1381.
- SCHROEDER, W.A., SHELTON, J.B. & SHELTON, J.R. (1969): An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide: Application to catalase. Arch. Biochem. Biophys. 130, 551-556.
- SCHULZ, G.E. & SCHIRMER, R.H. (1979): Principles of Protein Structure. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.
- STRYCH, W. (1981): Proteinchemischer Vergleich der Hämocyaninuntereinheiten aus den Spinnen *Eurypelma californicum* und *Cupiennius salei*. Dissertation, Universität München.
- TAKESADA, H. & HAMAGUCHI, K. (1968): Circular dichroism of hemocyanin. J. Biochem. 63, 725-729.
- TALLANDINI, L., SALVATO, B. & JORI, G. (1975): Photochemical effects associated with the copper absorption bands of the native hemocyanin from *Octopus vulgaris*. FEBS Letters 54, 283-285.
- TAMBURRO, A.M., SALVATO, B. & ZATTA, P. (1976): A circular dichroism study of some hemocyanins. Comp. Biochem. Physiol. 55 B, 347-356.
- THORNTON, J.M. & SIBANDA, B.L. (1983): Amino and carboxy-terminal regions in globular proteins. J. Mol. Biol. 167, 443-460.
- TOULME, J.-J., VILLA, F. & GOYFFON, M. (1976): Étude spectroscopique des modifications structurales de l'hémocyanine de scorpion induites par les variations de pH et l'addition de différents sels. Biochimie 58, 681-688.
- VAN BRUGGEN, E.F.J., SCHUTTER, W.G., VAN BREEMEN, J.F.L., BIJLHOLT, M.M.C. & WICHERTJES, T. (1981): The hemocyanins. In: Elektronmicroscopy of proteins (ed. Harris, J.R.) 1, pp. 1-38, Acad. Press, New York.
- VAN BRUGGEN, E.F.J. (1983): An electron microscopist's view of the quaternary structure of arthropodan and molluscan hemocyanins. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood, E.J., ed.). Life Chem. Rep., Suppl. 1, pp. 1-14, Harwood Academic Publ., Chur, London, New York.
- VAN HOLDE, K.E. (1967): Physical studies of hemocyanins. III. Circular dichroism and absorption spectra. Biochemistry 6, 93-99.
- VAN HOLDE, K.E. & MILLER, K.I. (1982): Haemocyanins. Quart. Rev. Biophys. 15, No. 1, 1-129.

- VENKATACHALAM, C.M. (1968): Stereochemical criteria for polypeptides and proteins. V. Conformation of a system of three linked peptide units. *Biopolymers* 6, 1425-1436.
- VEREIJKEN, J.M., SCHWANDER, E.H., SOETER, N.M. & BEINTEMA, J.J. (1982): Limited proteolysis of the 94000-Dalton subunit of Panulirus interruptus hemocyanin; the carbohydrate attachment site. *Eur. J. Biochem.* 123, 283-289.
- VEREIJKEN, J.M., DE Vlieg, J. & BEINTEMA, J.J. (1984): Panulirus interruptus hemocyanin: The amino-acid sequence of the region containing one copper-binding site and the sites susceptible to limited proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 788, 298-305.
- WAXMAN, L. (1975): The structure of arthropod and mollusc hemocyanins. *J. biol. Chem.* 250, 3796-3801.
- WEBER, K. & OSBORN, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- WEEKE, B. (1973): Crossed immunoelectrophoresis. In: A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications (ed. Axelsen, N.H., Krøll, J. & Weeke, B.), Scand. J. Immunol. 2, Suppl. 1, 47-56.
- WILLIAMS, R.W. & HENDRICKSON, W.A. (1984): Raman spectroscopic analysis of the secondary structure in Panulirus interruptus hemocyanin. *FEBS Letters* 165, 223-226.
- WITTERS, R., GOYFFON, M. & LONTIE, R. (1974): Etude de l'hemocyanine de Scorpion par dichroïsme circulaire. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 278, 1277-1280.
- WOOD, E.J. & BANNISTER, W.H. (1968): The effect of photooxidation and histidine reagents on Murex trunculus haemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 154, 10-16.
- WOOD, E.J. & DALGLEISH, D.G. (1973): Murex trunculus haemocyanin. 2. The oxygenation reaction and circular dichroism. *Eur. J. Biochem.* 35, 421-427.
- WYCKOFF, H.W. (1968): Compensating nature of substitutions in pancreatic ribonucleases. *Brookhaven Symp. Biol.* 21, 252-258.
- YANG, C.Y., PAULY, E., KRATZIN, H. & HILSCHMANN, N. (1981): Chromatographie und Rechromatographie in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Peptidgemischen. Die vollständige Primärstruktur einer Immunglobulin L-Kette vom κ -Typ, Subgruppe I. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 1131-1146.
- YOKOTA, E., MOORE, M.D., BEHRENS, P.Q. & RIGGS, A.F. (1983): Structural studies of hemocyanin II from Limulus polyphemus: A review of progress and prospects. In: Structure and function of invertebrate respiratory proteins (Wood, E.J., ed.). *Life Chem. Rep.*, Suppl. 1, pp. 75-80, Harwood Academic Publ., Chur, London, New York.

- YOKOTA, E. & RIGGS, A.F. (1984): The structure of the hemocyanin from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*: The amino acid sequence of the largest cyanogen bromide fragment. *J. Biol. Chem.* 259, 4739-4749.
- ZATTA, P. & SALVATO, B. (1981): The polypeptide chains of *Carcinus maenas* hemocyanin. In: *Invertebrate Oxygen-Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function* (ed. Lamy, J. & Lamy, J.), pp. 151-158, Marcel Dekker, New York.
- ZUCKERKANDL, E. (1965): The evolution of hemoglobin. *Sci. American* 212 (5), 110-118.
- ZWILLING, R., DÖRSAM, H., TORFF, H.-J. & RÖDL, J. (1981): Low molecular mass protease: Evidence for a new family of proteolytic enzymes. *FEBS Letters* 127, 75-78.

LEBENS LAUF

Vor- und Familienname: Peter Wolfgang Maria Reisinger

Geburstag und -ort: 20. Mai 1951, München

Eltern: Franz Reisinger und Gertraud Reisinger,
geb. Wegmann

Sept. 1957 Einschulung in die Volksschule an der
Limesstraße, München-Neuaubing

Sept. 1962 Eintritt in das Humanistische Gymnasium
München-Pasing (jetzt Karlsgymnasium)

Juni 1972 Abitur

Nov. 1972 Beginn des Studiums der Biologie an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

1975 Diplom-Vorprüfung

1978 Mündliche Diplom-Biologen-Hauptprüfung
(Botanik, Genetik, Biochemie,
Zusatzfach Mikrobiologie)

1978 - 1979 Diplomarbeit unter Anleitung von
Prof. Dr. W.P. Hammes mit dem Thema:
"Die Wirkung der Peptidantibiotika
Nisin und Subtilin auf die in vitro
Synthese von Murein".

Okt. 1979 Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit
am Zoologischen Institut der Universität
München unter Anleitung von Prof. Dr. Bernt
Linzen mit dem Thema: "Zur Primär- und
Sekundärstruktur des Hämocyanins der
Vogelspinne Eurypelma californicum"

seit
Jan. 1984 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Bio-
chemischen Laboratorium der Hals-, Nasen-
und Ohrenklinik des Klinikums Großhadern
der Universität München

